ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG INTEGRALER PROTEINE DER ÄUSSEREN MEMBRAN VON ESCHERICHIA COLI

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Biologie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
WOLFGANG GARTEN
aus Tübingen

1974

75 52

ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG INTEGRALER PROTEINE DER ÄUSSEREN MEMBRAN VON ESCHERICHIA COLI

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Biologie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
WOLFGANG GARTEN
aus Tübingen

1974

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 3. Oktober 1974

Dekan:	Prof. Dr. F.-W. Bentrup
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. U. Henning
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. V. Braun

aku- Fotodruck, 86 Bamberg, Färbergasse 8 R

Herrn Prof. Dr. U. Henning danke ich für die Überlassung des Themas, für sein reges Interesse an dieser Arbeit, für wertvolle Ratschläge und die zeitaufwendige Durchführung zahlreicher Aminosäureanalysen.

Für die Fertigstellung des Manuskriptes möchte ich Frau M. Danner danken, ebenso Herrn E. Freiberg für das Zeichnen der Schaubilder.

Nicht zuletzt trug die bereitwillige Unterstützung aller Mitarbeiter dieses Institutes zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Der Max-Planck-Gesellschaft danke ich für die Gewährung eines Stipendiums.

Inhaltsverzeichnis Seite

1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	11
2.1.	Chemikalien, Enzyme, Medien	11
2.2.	Anzucht von Bakterien	12
2.3.	Präparation von Hülsen ("ghosts")	13
2.4.	Säulentrennungen	14
2.4.1.	Gelfiltration	14
2.4.2.	Ionenaustauschersäulen	16
2.4.2.1.	DEAE-Cellulose	16
2.4.2.2.	Phosphocellulose	17
2.5.	Gelelektrophoresen	17
2.5.1.	Na-dodecylsulfat-Gelelektrophorese	17
2.5.2.	Na-dodecylsulfat-Gelelektrophorese nach Swank und Munkres	18
2.5.3.	Na-dodecylsulfat-Gelelektrophorese nach Bragg und Hou	18
2.6.	Proteinbestimmungen	18
2.6.1.	Biuret-Methode	18
2.6.2.	Aminosäureanalyse nach saurer Hydrolyse / Methode zur Bestimmung von Proteingehalt	19
2.6.3.	Densitometrische Messungen von Proteinbanden und Bestimmung deren Proteingehalt in Gelen	19
2.7.	Bestimmung von Radioaktivität	22
2.8.	Methode zur Bestimmung von Na-dodecylsulfat, das nach mehrmaliger Extraktion mit Aceton von den Hülsenproteinen nicht entfernt werden konnte	22
2.9.	Molekulargewichtsbestimmung durch Na-dodecylsulfat-Gelelektrophorese	23
2.10.	Zuckerfärbung	26
2.11.	Bromcyanspaltung	26
2.12.	Verdauung von Hülsenproteinen mit Carboxypeptidasen	26
2.12.1.	Binden von den Carboxypeptidasen A und B an einen makromolekularen Träger	28

Seite

2.13. N-terminale Analysen von Hülsenproteinen durch Dansylierung 29

2.14. Tryptische Verdauung und "Fingerprints" 29

2.14.1. Tryptische Verdauung und "Fingerprints" (Methode I) 29

2.14.2. "Fingerprints" tryptischer Peptide von radioaktiv markierten Proteinen (Methode II) 30

3. Ergebnisse 31

3.1. Ergebnisse aus Vorversuchen 31

3.1.1. Versuche zur Auftrennung der Hülsenproteine mit Hilfe der Ionenaustauscher-Säulenchromatographie 31

3.1.2. Vorversuche zur Isolierung und Charakterisierung von Hülsenproteinen 33

3.1.2.1. Tryptische Peptide 33

3.1.2.2. N-terminale Analyse der Hülsenproteine durch Markierung mit Dansyl-Chlorid 34

3.2.1. Isolierung von Protein I und II 35

3.2.2. Eigenschaften von isoliertem Protein I und II 40

3.2.2.1. Löslichkeitseigenschaften 40

3.2.3. Nachweis von Zucker bei den Hülsenproteinen I und II 42

3.3. Protein I 43

3.3.1. Aminosäurezusammensetzung 43

3.3.2. Tryptische Peptide 46

3.3.3. Carboxypeptidasen 48

3.3.3.1. Untersuchungen über die Bedingungen, unter denen die Hülsenproteine I und II von Carboxypeptidasen angegriffen werden 49

3.3.3.2. Carboxypeptidase B 49

3.3.3.3. Carboxypeptidase A 49

3.3.3.4. Carboxypeptidase A und B 52

3.3.4. Spaltung von Protein I mit Bromcyan 53

Seite

3.3.4.1.	Einfluß von Temperatur und Inkubationsdauer	54
3.3.4.2.	Molekulargewichte der Bromcyanspaltprodukte von Protein I	55
3.4.	Protein II	65
3.4.1.	Aminosäurezusammensetzung	65
3.4.2.	Tryptische Peptide	67
3.4.3.	Carboxypeptidasen	68
3.4.4.	Spaltung von Protein II mit Bromcyan	68
3.5.	Bestimmung des Polypeptidkettenverhältnisses von den Proteinen I und II in den Hülsen	70
4.	Diskussion	72
4.1.	Isolierung von Protein I und II	72
4.2.	Homogenität von Protein I und Protein II	75
4.2.1.	Protein I	75
4.2.2.	Protein II	78
4.3.	Polarität - Lipophilie	79
4.4.	Vergleich von Protein I und II miteinander	81
4.5.	Vergleich von Daten dieser Arbeit mit Ergebnissen anderer Autoren	83
4.6.	Bedeutung der Ergebnisse von Protein I und II für Determination der Zellform und für Membranmodelle	85
5.	Zusammenfassung	90
6.	Literatur	93
7.	Abkürzungen	98

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546514_0103

1. Einleitung

Die Biochemie grundlegender biologischer Prozesse wie Wachstum, Zellteilung und Formgebung von Organismen ist bislang noch unbekannt. Jede Zelle trägt die genetische Information in sich, wie das Wachstum und die Zellteilung - beides dynamische Aspekte der Zellmorphologie - ablaufen sollen; ebenso ist genetisch festgelegt, welche Gestalt die Zelle annehmen soll. Die Mechanismen dieser Vorgänge sind noch völlig unbekannt. Alle diese Prozesse (Wachstum, Zellteilung und Formgebung) sind eng miteinander verknüpft; alle drei Prozesse laufen beim Zusammenbau der Zellwand ab.

Wie kommt es, daß ein Coccus als Kugel, Escherichia coli als Stäbchen und Spirillum als schraubenförmiges Gebilde wächst? Es konnte gezeigt werden, daß die Elternzelle nicht als Matrix dient, an der sich die Nachkommen bei der Ausbildung ihrer Form orientieren. Eine temperatursensitive Mutante von Escherichia coli, die bei 30°C oder darunter als Stäbchen heranwächst, bei Temperaturen über 42°C unter bestimmten Bedingungen sphärische Gestalt annimmt, so weiterwächst und sich unbegrenzt teilen kann, findet bei Erniedrigung der Wachstumstemperatur auf 30°C ihre normale Gestalt als Stäbchen wieder (1).

Von Schwarz und Leutgeb (2) konnte gezeigt werden, daß Sphäroplasten von Escherichia coli in einem langdauernden Prozeß, während dessen keine Zellteilung abläuft, die ursprüngliche Stäbchenform wiederherstellen. Da sich also ein stäbchenförmiges Bakterium aus einem Sphäroplasten entwickeln kann, muß die Zelle auf irgendeine Weise in der Lage sein, von neuem eine be-

stimmte Geometrie, eine für das Bakterium charakteristische zylindrische Form in ihren ursprünglichen Ausmaßen (Länge und Durchmesser) wiederherzustellen.

Zwei bekannte Mechanismen, die zur Ausbildung von wohl definierten und oft hoch spezifischen, biologischen Strukturen führen, werden unter den Begriffen "self assembly" und "sequential assembly" zusammengefaßt (3). Unter "self assembly" versteht man die spontane Zusammenlagerung von Proteinen zu übergeordneten Strukturen, ohne daß neben der Primärstruktur von Proteinen weitere spezifische Informationen nötig wären. Beispiele hierfür findet man beim Zusammenbau von Viren (z.B. Tabakmosaikvirus). Auch beim "sequential assembly" lagern sich Proteine spontan zusammen. Im Gegensatz zum "self assembly" ist beim "sequential assembly" die Reihenfolge festgelegt, in der sich die einzelnen Untereinheiten zusammenlagern. Z.B. können enzymatische Veränderungen von Untereinheiten in einer bestimmten Phase des Prozesses erforderlich sein, bevor weitere Zusammenlagerungen ablaufen können (4,5). D.h., das "sequential assembly" benötigt in einer bestimmten Phase zusätzlich Information, damit wird dieser Prozeß zeitabhängig. Dieser Mechanismus ist z.B. bei der Entstehung des T4 Phagen verwirklicht (4,5).

Läßt man vielzellige Organismen außer Betracht, so kann man mit beiden molekularen Mechanismen zu den biologischen Strukturen gelangen, die fast alle morphologischen Formen ermöglichen.

Die Zellmorphologie ist wenigstens bei Bakterien gleichbedeutend mit der Morphologie der Zellhülle. Um der Lösung des Problems, was

die Form bestimmt, näher zu kommen, muß man sich zunächst eben diesem Bestandteil der Zelle zuwenden.

Die Zellwand von Escherichia coli und von anderen gramnegativen Bakterien ist aus drei verschiedenen Schichten aufgebaut: Innen befindet sich die Cytoplasmamembran, darauf folgt nach außen hin eine Mureinschicht, die von der äußeren Membran umgeben ist (6,7,8). Welche der drei Schichten kommt als möglicher Kandidat für die Festlegung der Zellform in Frage und welche Komponenten der Zellhülle scheiden eventuell von vornherein als formgebende Elemente aus?

Von Weidel und Mitarbeitern (9) konnte die Mureinschicht intakt als "Sacculus" isoliert werden. Der Sacculus hat Form und Größe der Zelle aus der er isoliert wurde. Daher wurde ihm oft die "formbestimmende Rolle" zugeschrieben. Die Information, welche Form und Größe das Mureinnetz haben soll, kann nicht oder jedenfalls nicht alleine im Murein selbst stecken (10,2). Vielmehr stammt die Information für die Vernetzung der Polysaccharidketten durch Peptidbrücken zu einem Mureinsacculus von Enzymen. Deren Spezifität, Aktivität oder räumliche Anordnung durch eine schon vorgegebene Matrix dürften Form und Größe vom Sacculus bestimmen (10). Das Murein kann von seiner Chemie her nicht alleine "formbestimmend" sein, wenngleich es mit zur Form beitragen könnte, etwa als Cofaktor für andere Strukturelemente wie Proteine. Zweifellos hat der Mureinsacculus "formerhaltende" Eigenschaften und trägt zur mechanischen Stabilität der Zelle bei (10). Bakterienzellen, die keine Mureinschicht mehr haben, was durch Abbau des Mureins mit Lysozym oder durch Hemmung der Mureinbiosynthese erreicht werden kann, werden

zu Sphäroplasten, die Kugelform haben (11,12). In gewöhnlichen Medien lysieren Sphäroplasten; diese sind nur in einem Medium lebensfähig, das dem Cytoplasma des Sphäroplasten isotonisch ist (6 atm oder mehr (13)). D.h., die Mureinschicht schützt die Zelle gegen den osmotischen Druckunterschied zwischen Cytoplasma und gewöhnlichem Medium.

Daß Murein für die Formgebung von Bakterienzellen jedenfalls nicht immer erforderlich ist, geht auch aus Befunden über Halobakterien hervor, die höchst wahrscheinlich kein Murein haben (10,14,15,16), aber trotzdem als Stäbchen wachsen.

So kommen als Kandidaten für die Bestimmung der Zellform nur noch die Cytoplasmamembran und die äußere Membran in Betracht.

Seitdem es möglich ist, die innere (Cytoplasma-) und äußere Membran von gramnegativen Bakterien voneinander zu trennen (17,18,19), konnte gezeigt werden, daß sie nicht nur strukturell, sondern auch funktionell voneinander verschieden sind (19). In der Cytoplasmamembran sind 40% des Zellhüllproteins und 50% des Lipids der gesamten Zellhülle vorhanden (19). Die Cytoplasmamembran enthält die Enzyme und Coenzyme der oxydativen Phosphorylierung (19,20), Enzyme für die Synthese von Phospholipiden (21,22), Murein (23) und Lipopolysaccharid (24). In ihr laufen für die Zelle lebensnotwendige Prozesse ab. Man muß der Cytoplasmamembran eine für den Stoffwechsel wichtige Funktion zuschreiben und vielleicht nicht von vornherein in ihr eine strukturelle Rolle vermuten.

Wie sieht es aber mit der äußeren Membran von Bakterienzellen aus, ist sie in der Lage, die Zellform zu bestimmen?

Untersuchungen von Birdsell und Cota-Robles (25) zeigten, daß plasmolysierte Escherichia coli-Zellen nach Zerstörung der Mureinschicht durch Lysozym ihre Stäbchenform beibehielten, wenn der osmotische Druck im Medium hoch genug gehalten wurde. Die äußere Membran behielt also die Form von Escherichia coli ohne Unterstützung der Mureinschicht und der Cytoplasmamembran.

Von Escherichia coli und anderen gramnegativen Bakterien (Salmonella typhimurium, Proteus mirabilis, Serratia marcescens, Pseudomonas aeruginosa, Spirillum serpens und Caulobacter crescentus) konnten Hülsen ("ghosts") unter Beibehaltung der ursprünglichen Zellform isoliert werden (26,27). Abb. 1 zeigt Hülsen von Escherichia coli, die stäbchenförmige Gestalt bewahren und nur noch aus der äußeren Membran der Zellwand bestehen (26). Alles intrazelluläre Material verloren sie während der Präparation. Nur einige Membranbruchstücke, die aus der Cytoplasmamembran stammten, finden sich innerhalb der Hülsen (27). Diese Hülsen enthalten keine wesentlichen Mureinmengen mehr (26). Das Trockengewicht der Hülsen von Escherichia coli beträgt 10 bis 15% vom Trockengewicht der ganzen Zellen (27). Die Hülsen selbst bestehen aus etwa 25% Phospholipid, 25 bis 30% Lipopolysaccharid und 45 bis 50% Protein (27). Phospholipid kann, ohne daß dabei die Hülsengestalt verloren geht, entfernt werden. Danach bleiben Hülsen mit etwa 70% Proteinanteil übrig (26,27). Damit können die stäbchenförmigen Hülsen vielleicht als isolierte Matrix für die Zellform von Escherichia coli gelten. Der hohe Proteinanteil läßt es jedenfalls denkbar erscheinen, daß die äußere Membran nach den mole-

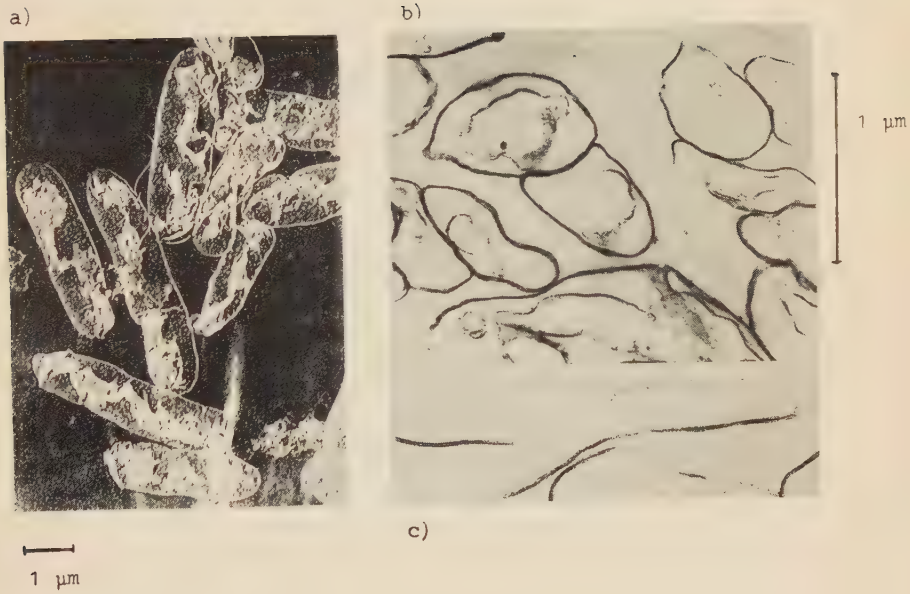


Abb. 1 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von E. coli-Hülsen (Sie sind der Arbeit von Henning et al. (27) entnommen.)

a) Hülsen bedampft, b) Hülsen im Ultradünnschnitt, c) Ausschnitt von b) (2.5-fach vergrößert)

Die Elektronenmikroskopie wurde nach einer früher beschriebenen Methode (70) an einem Philips EM 201 durchgeführt.

kularen Bauprinzipien "self assembly" bzw. "sequential assembly", wie eingangs erörtert, entsteht.

Die Vorstellung, daß Membranproteine das formgebende Element der Bakterienzelle bilden, setzt voraus, daß diese in der äußeren Membran dicht gepackt in enger Wechselwirkung miteinander stehen; womöglich ist nur ein oder sind nur wenige Proteine regelmäßig in der Membran zu einer Art Oberflächenkristall angeordnet. Um diese Hypothese von der Rolle der Proteine in der äußeren Membran als formgebendes Element zu stützen oder abzulehnen, sind genaue Kenntnisse der Proteinzusammensetzung in den Hülsen erforderlich. Hier interessiert zunächst vor allem die Frage, wieviel verschiedene Proteine in der Hülse vorhanden sind und in welchem Mengenverhältnis diese Proteine auftreten.

Unterwirft man Hülsen von Escherichia coli einer Na-dodecylsulfat-Gelelektrophorese, so werden Hülsenproteine in drei Hauptbanden (I, II und IV) und eine Nebenbande (III) aufgetrennt (Abb. 2) (26). Für jede der 4 Banden wurde das scheinbare Molekulargewicht elektrophoretisch bestimmt: I (40 000); II (28 000); III (18 000) und IV (8 000 - 10 000) (26).

Zwei weitere Banden (IIa und IIIa) traten nur gelegentlich auf, ohne daß die Hülsen morphologisch anders waren. Bande IIa ist wahrscheinlich ein tryptisches Fragment von Proteinbande II*, aus dem auch bei der Hülsenaufarbeitung die Proteinbande II als tryptisches Fragment entsteht. (Proteinbande II* hat ein Molekulargewicht etwas unterhalb 40 000.) Bande IIIa ist Lysozym, das nicht vollkommen entfernt wurde. Somit können beide Banden für die morphologische Betrachtung vernachläßigt werden.

Betrachtet man das Bandenmuster der Na-dodecylsulfat-Gelelektrophorese mit seinen 4 Banden, so taucht das Problem auf, ob die einzelnen Banden der Gelelektrophorese homogene Polypeptid-

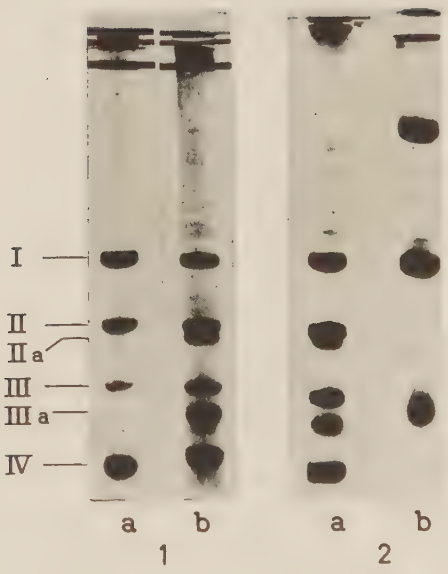


Abb. 2 Na-dodecylsulfat-Gelelektrophorese von Hülsen (26,27)

Unterschiede im Bandenmuster wurden durch verschiedene Hülsenpräparationen (26) erhalten (1a, 1b). Abhängigkeit des Bandenmusters von der Elektrophoresemethode (2a, 2b). Hülsen wurden bei Abb. 2a 5 Minuten bei 100°C und bei Abb. 2b 2 Stunden bei 37°C im Probenpuffer inkubiert; sonst waren die Elektrophoresebedingungen in beiden Fällen dieselben (27), s. auch Abschn. 2.5.1.

ketten repräsentieren, oder ob in einzelnen Banden mehrere verschiedene Proteine vorhanden sind.

Vom Protein aus der Bande IV, das bereits isoliert werden konnte (28), wurde gezeigt (27), daß es sich hierbei um das von Braun et al. (29, 30) beschriebene Lipoprotein handelt. Die Daten der Aminosäureanalyse von Proben der Bande IV stimmen mit denen vom Lipoprotein gut überein (27,29).

Moldow et al. (31) konnten zeigen, daß Polypeptidketten aus der äußeren Membran von Escherichia coli, die als Hauptbande ("major band") mit dem scheinbaren Molekulargewicht um 40 000 in der Na-dodecylsulfat-Gelelektrophorese erschienen (32), unter anderen Elektrophoresebedingungen (Harnstoff-Gelelektrophorese) weiter aufgetrennt wurden, und die Proteine aus dieser Bande bei Chromatographie auf Ionenaustauschern in verschiedenen Fraktionen auftraten. Dieses Verhalten deutet auf unterschiedliche Ladung der Polypeptidketten hin und es erscheint daher unwahrscheinlich (31), daß die Hauptbande mit einem Molekulargewicht um 40 000 ein einziges Strukturprotein enthält. Auch Bragg und Hou (33) konnten diese Proteinbande durch Modifikation der Na-dodecylsulfat-Gelelektrophorese in drei neue Banden auflösen. Dagegen ändert die Gelelektrophorese nach Bragg und Hou (33) das Bandenmuster der Hülsenproteine von Escherichia coli nicht, was als Indiz für die Homogenität der Proteine in den einzelnen Banden gewertet werden mag.

Shapiro et al. (34) fanden Bandenmuster von Zellwandproteinen, die je nach Vorbehandlung des Membranproteinmaterials (40°C bzw. 100°C) unterschiedlich ausfielen. Ebenfalls unterschiedliche Bandenmuster erhielt Inouye und Yee (35), wenn

Membranmaterial bei 70°C bzw. 100°C oder mit N,N-Dimethylformamid in sauerem Milieu vorbehandelt wurde.

Henning et al. (27) konnten zeigen, daß das Hülsenmaterial je nach Temperaturvorbehandlung unterschiedliche Bandenmuster ergibt. Bei niedriger Temperatur (37°C/2 Stunden) erscheinen nur drei Banden mit den Molekulargewichten 100 000, 40 000 und 15 000, wobei gezeigt werden konnte, daß die Bande mit dem Molekulargewicht um 100 000 alle 4 Proteinbanden enthält, die durch Vorbehandlung von Hülsen bei höherer Temperatur (100°C/ 5 Minuten) erscheinen (Abb.2-2).

Sowohl Zahl als auch Lage der Banden waren nach den unterschiedlichen Bedingungen der Vorbehandlungen von Membranmaterial verschieden (27, 34,35,36).

Aus den unterschiedlichen Elektrophoreseergebnissen sieht man, daß die Auftrennung von Proteinen nur nach der Na-dodecylsulfat-Gelelektrophorese allein in keiner Weise ausreicht, um Homogenität der Proteine in einzelnen Banden auch nur anzunehmen. Vielmehr ist es hierfür notwendig, die Proteine einzelner Banden zu isolieren und chemisch zu charakterisieren.

Dies wurde in der vorliegenden Arbeit für die Proteine der Banden I und II aus Hülsen von Escherichia coli durchgeführt.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien, Enzyme, Medien

Die Chemikalien wurden von folgenden Quellen bezogen: Antibiotic Medium No. 3 von Difco-Laboratories (Detroit, USA); Diaminopimelinsäure von Sigma Chemical Company (St. Louis, USA); ^{3}H-Aminosäuren, ^{35}S-Natriumdodecylsulfat von Amersham-Buchler (Braunschweig); Triton X-100, Brij 35 (Polyäthylenglykolmonolaurylläther), DEAE-Cellulose, Phosphocellulose, Trypsin-TPCK behandelt (EC 3.4.4.4.), N,N,N',N'-Tetramethylendiamin (TEMED), Natriumdodecylsulfat (reinst, salzfrei), 5-Dimethylaminonaphthalin-1-sulfonylchlorid (Dansyl-Chlorid), Hippuryl-L-phenylalanin, Ninhydrin von Serva-Entwicklungslabor (Heidelberg); Pyronin Y von K+K Laboratories Inc. (Plainview, N.Y., USA); Enzacryl AA von Koch-Light Laboratories Ltd. (Colnbrook, Bucks., England); Hippuryl-L-Arginin, Coomassie Brilliant Blue von Schwarz/Mann (Orangeburg, N.Y., USA); Omnifluor von NEN Chemicals GmbH (Frankfurt); Carboxypeptidase A (EC 3.4.2.1.), Carboxypeptidase B (EC 3.4.2.2.), Lysozym (EC 3.2.1.17.), Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) von Boehringer (Mannheim); Sephadex G100 (40-120 µ particle size), Sephadex G200 (40-120 µ particle size) von Pharmacia (Uppsala, Schweden); Biogel P100 (100-200 mesh), Biogel P200 (100-200 mesh) von Bio-Rad Laboratories (München); ß-Mercaptoäthanol von Fluka AG (Buchs, Schweiz); N,N'-Methylenbisacrylamid (Bis), Acrylamid von Eastman Kodak (Rochester, USA).

Alle übrigen Chemikalien waren p.a.-Erzeugnisse der Firma Merck AG (Darmstadt).

Alle Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt.

2.2. Anzucht von Bakterien

Für die meisten Experimente wurden die Hülsenproteine aus Escherichia coli B (Merck, Darmstadt) gewonnen. Dieser Stamm wurde in einem Salz-Glucose Medium, welches mit 1% Hefeextrakt angereichert wurde, gezogen. Für die übrigen Daten wurden die Proteine aus Escherichia coli K12, Stamm W945-T3282 (1) isoliert. Dieser wuchs bei 30°C in Antibiotic Medium No. 3 unter starker Belüftung. Dem Medium wurden 20 µg/ml Diaminopimelinsäure und 50 µg/ml Thymin zugesetzt. Der Stamm Escherichia coli HfrH wurde unter Zusatz von tritiummarkierten Aminosäuren zur radioaktiven Markierung von Proteinen aufgezogen. Eine 10 ml-Kultur, die 16 Stunden bei 30°C unter Belüftung wuchs, wurde nach Waschen mit steriler 0.85%-iger NaCl-Lösung zum Animpfen von 750 ml Minimalmedium verwandt. Dieses Medium enthielt folgende Substanzen:

0.12	g	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$
6.0	g	K_2HPO_4
1.2	g	Citronensäure
2.1	g	$Na(NH_4)HPO_4 \cdot 4H_2O$
5%		Antibiotic Medium No. 3
0.4%		Glucose
37.5	mg	Thymin
2	mg	Vitamin B_1

und jeweils 50 µCi folgender ^3H-markierter Aminosäuren:

Aminosäuren	spez. Aktivität mCi/mMol
L-Alanin	50-200
D,L-Glutaminsäure-2-^3H	500-2000
Glycin-2-^3H	250-2000

L-Leucin-4,5-^{3}H	> 15 000
L-Isoleucin-4,5-^{3}H	> 2 000
L-Lysin-4,5-^{3}H	> 2 000
L-3-Phenylalanin (Ring 4-^{3}H)	> 5 000
L-Tyrosin-3,5-^{3}H	> 25 000
L-Valin-2,3-^{3}H	> 10 000

Nach 7 Stunden Wachstum (30°C, starke Belüftung) wurden die Zellen geerntet. Die Zellen der beiden letztgenannten Stämme wurden in der späten logarithmischen Phase des Wachstums geerntet (5 bis 8 x 10^8 Zellen/ml).

2.3. Präparation von Hülsen ("ghosts") (26)

Die Hülsenpräparation wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Alle Lösungen enthielten, wenn nicht anders erwähnt, 8 mM $MgSO_4$. Die Zellen wurden aus dem Nährmedium abzentrifugiert (10 Minuten bei 16 000 x g), 1 x mit 0.85%-iger NaCl-Lösung gewaschen, und die Zellen (100 mg Feuchtgewicht/ml) in 200 mM Tris-HCl-Puffer pH 7.5, der 40% Rohrzucker und 1% Triton X-100 enthielt, suspendiert. Nach 16 Stunden wurden die Zellen abzentrifugiert (16 000 x g , 10 Minuten) und im 0.5-fachen Volumen bezüglich der Rohrzucker-Triton X-100-Suspension einer 4 M Harnstofflösung aufgenommen. Nach zweistündigem Stehen wurde die Suspension abzentrifugiert (10 Minuten, 16 000 x g), 2 x mit 20 mM Tris HCl-Puffer pH 9.0 gewaschen und in 0.25-fachem Volumen in demselben Puffer aufgenommen, dem 1 mg/ml Trypsin (2 000 E/g, Merck) zugesetzt wurde. Nach zweistündiger Verdauung wurden die Hülsen 10 Minuten bei 16 000 x g abzentrifugiert, mit 8 mM $MgSO_4$ (0.5 Volumen) gewaschen, und der Niederschlag nach

Zentrifugation (10 Minuten, 16 000 x g) im 0.2-fachem Volumen einer 50 mM Ammoniumacetatlösung, die 65 mM NaCl enthielt, suspendiert. Für mindestens 4 Stunden wirkte Lysozym (200 µg/ml) auf die Suspension ein. Das Lysozym wurde mit einer 3 M NaCl-Lösung aus den Hülsen herausgewaschen. Anschließend wurden die Hülsen für 30 Minuten in 4 M Harnstoff suspendiert, der nach Abzentrifugation (10 Minuten, 16 000 x g) 1 x mit 8 mM $MgSO_4$, dann 2 x mit destilliertem Wasser aus den Hülsen gewaschen wurde. Nach Gefriertrocknen der Hülsen wurden diese mit Chloroform-Methanol (2:1) extrahiert. Der Extrakt (0.2 mg Trockensubstanz pro ml Lösungsmittel) wurde nach zweistündigem Rühren abfiltriert und der Extraktionsvorgang 2 x wiederholt. Zum Schluß wurden die Hülsen an der Luft getrocknet. Die Präparation der Hülsen wurde im Phasenkontrastmikroskop verfolgt. Dabei blieb bei weitaus dem größten Teil der Hülsen (> 90%) die Stäbchenform erhalten. Die Na-dodecylsulfat-Gelelektrophorese zeigte ein charakteristisches Bandenmuster von 4 Banden (Abb. 2); falls dies nicht der Fall war, wurde der Trypsinschritt der Hülsenpräparation wiederholt.

2.4. Säulentrennungen

2.4.1. Gelfiltration

Mit folgenden Gelen wurden die Trennverfahren für die Proteine der Bande I und II durchgeführt:

Sephadex G100 (particle size 40-120 µ)
Sephadex G200 (particle size 40-120 µ)
Biogel P100 (100-200 mesh)
Biogel P200 (100-200 mesh)

Das Gelmaterial wurde mit dem Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM EDTA und 0.2% Na-dodecylsulfat) mindestens 16 Stunden äquilibriert, unter Vakuum der Wasserstrahlpumpe mindestens 30 Minuten entlüftet und 5 bis 10 Minuten in einem Wasserbad auf ca. 70°C erhitzt, um das Gel möglichst vollkommen von Luft zu befreien, da Gasblasen in den Gelen die Säulentrennung empfindlich stören. Gelmaterial wurde in Säulen mit einem Gelbettvolumen von ca. 700 ml auf eine Höhe von 120 cm gefüllt. Die Säulen wurden bei 30°C und 50°C betrieben. 150 bis 200 mg Hülsenmaterial wurde in ca. 8 ml Elutionspuffer (s.o.), der aber 1%-ig an Na-dodecylsulfat war, suspendiert und für 3 Minuten gekocht, wobei der größte Teil des Hülsenmaterials in Lösung ging. Nach 5-minütiger Zentrifugation (7 000 x g) wurde der fast klare Überstand auf die Säule aufgetragen und die Säule mit Elutionspuffer eluiert. Fraktionen zu 10 ml (30 Minuten) wurden gesammelt. Der Proteingehalt der einzelnen Fraktionen wurde durch Transmissionsmessung bei 278 nm verfolgt, Proben proteinhaltiger Fraktioenen wurden einer Na-dodecylsulfat-Gelelektrophorese unterworfen, um die Auftrennung der Hülsenproteine bei verschiedenen Säulenchromatographien zu ermitteln. Zur Reingewinnung der aufgetrennten Proteine wurden die entsprechenden Fraktionen lyophilisiert, das Material in Wasser gelöst (100 mg/ml einschließlich von Na-dodecylsulfat) und bei 4°C Aceton bis zur Endkonzentration von 90% zugefügt, wobei das Protein ausfiel und Na-dodecylsulfat in Lösung blieb. Der Niederschlag wurde noch 2 x mit 90%-igem Aceton gewaschen (37), um das restliche Na-dodecylsulfat zu entfernen, anschließend in Wasser suspendiert und lyophilisiert. Falls nach einmaliger Chromatographie das isolierte Protein nicht sauber genug war, wurde es in gleicher Weise rechromatographiert.

Da vom Trockengewicht nur etwa 20% Protein waren, wurde durch 2 x Waschen (1 mg Trockensubstanz/ml Wasser) das Protein von wasserlöslichen organischen Substanzen (vergl. Abschn. 3.2.1.) befreit.

2.4.2. Ionenaustauschersäulen

2.4.2.1. DEAE-Cellulose

Es wurden Säulen mit 55 bis 60 cm Füllhöhe und einem Bettvolumen von ca. 160 ml verwendet. Die DEAE-Cellulose wurde mit folgenden Elutionspuffersystemen äquilibriert:

a) 0.01 M Natriumphosphat pH 7.0; 5 M Harnstoff
b) 0.01 M Natriumphosphat pH 7.0; 0.5% Brij 35
c) 0.01 M Natriumphosphat pH 7.0; 1% Triton X-100

Die Trennversuche wurden sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 30°C und 50°C durchgeführt. Hülsenproteine (50 bis 60 mg) wurden in den jeweiligen Elutionspuffern suspendiert, 5 bis 10 Minuten bei 100°C gekocht, vom unlöslichen Hülsenmaterial abzentrifugiert (10 Minuten, 7 000 x g) und auf die Säulen aufgetragen. Nach Elution mit einem Säulenvolumen desselben Puffers, worin sich das Hülsenmaterial teilweise löste, wurde ein linearer NaCl-Gradient (0-2 molar, 450 ml Elutionsvolumen) im entsprechenden Puffersystem an die Säule angelegt und Fraktionen zu je 5 ml (30 Minuten) aufgefangen.

Bei Triton X-100-haltigem Puffer führten zu hohe NaCl-Konzentrationen (über 1 M) zum Abscheiden des Detergenz.

2.4.2.2. Phosphocellulose

Die Versuche wurden in entsprechender Weise wie die DEAE-Cellulose-Trennversuche (s. Abschn. 2.4.2.1.) durchgeführt.

2.5. Gelelektrophoresen

2.5.1. Na-dodecylsulfat-Gelelektrophorese

Im allgemeinen wurde die Na-dodecylsulfat-Gelelektrophorese nach Methode II in (27) durchgeführt. Das Gel enthielt 10% Acrylamid, 0.133% Methylenbisacrylamid, 0.2% Na-dodecylsulfat in 200 mM Natriumphosphat pH 7.0, Elektrophoresepuffer war 20 mM an Natriumphosphat pH 7.0 und enthielt 0.1% Na-dodecylsulfat. Proteinproben wurden in 10 mM Natriumphosphat pH 7.0, der 1% Na-dodecylsulfat und 1% Mercaptoäthanol enthielt, durch 5-minütiges Erhitzen auf 100°C in Lösung gebracht. Unlösliche Rückstände wurden an der Tischzentrifuge bei ca. 2 000 x g abzentrifugiert und verworfen. Die mit 0.01 bis 0.05 mg Protein beladenen Gele (8 cm Länge, 0.6 mm ø) wurden bei 6 mA/Gel ca. 3 Stunden der Elektrophorese unterworfen, anschließend mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt (44).

Zur Analyse der kleineren Peptidketten, die bei der Bromcyanspaltung von Protein II entstanden, wurde die Acrylamidkonzentration auf 13.65% und die Methylenbisacrylamid-Konzentration auf 0.35% erhöht.

2.5.2. Na-dodecylsulfat-Gelelektrophorese nach Swank und Munkres (38)

Für Bromcyanspaltprodukte von Protein I wurde zum Vergleich mit anderen Arbeiten (36) eine Methode nach Swank und Munkres (38) durchgeführt.

2.5.3. Na-dodecylsulfat-Gelelektrophorese nach Bragg und Hou (33)

Bei dieser Methode (33, System 2) wird dem elektrischen Feld zusätzlich ein pH-Gradient überlagert, in dem dann die mit Na-dodecylsulfat gelösten Proteine wandern.

2.6. Proteinbestimmungen

2.6.1. Biuret-Methode (39)

Um Ausbeuten an Protein bei Trennverfahren zu bestimmen, wurde die Biuret-Methode (39) angewandt und wie folgt berechnet:

$$\text{mg Protein} = \text{Extinktion}_{\text{bei } 546 \text{ nm}} \times \text{Faktor}$$

Mit dem Faktor 16.5 wurden Proteinwerte in guter Übereinstimmung mit nachfolgender Methode erhalten.

2.6.2. Aminosäureanalyse nach saurer Hydrolyse von Protein / Methode zur Bestimmung von Proteingehalt

Ca. 1 bis 2 mg Protein wurden in 5 ml 5 N HCl unter Vakuum bei 110°C 24 Stunden, bei Anwesenheit von Na-dodecylsulfat und Polyacrylamidgel-Bestandteilen unter Zusatz von 0.050 ml Mercaptoäthanol (40), hydrolysiert. Das Aminosäuregemisch wurde am Rotationsverdampfer von Salzsäure befreit und in einem geeigneten Volumen des Probenpuffers für den Analysator aufgenommen. Die Aminosäureanalyse wurde mit Hilfe eines Beckman Unichrom Amino Acid Analyzer oder eines Beckman Multichrom B Column Chromatograph 4255 durchgeführt.

2.6.3. Densitometrische Messungen von Proteinbanden und Bestimmung deren Proteingehalt in Gelen (41,42)

Proteinproben (von 1 bis 20 µg) wurden wie unter Methode Abschn. 2.5.1. beschrieben elektrophoretisch aufgetrennt und angefärbt. Nach elektrophoretischer Entfärbung der nicht-proteinhaltigen Gelabschnitte wurden die Gele zur vollständigeren Entfärbung des Hintergrundes im Dunkeln durch 7-tägiges Stehen in Entfärberlösung (Wasser-Methanol-Eisessig = 35:2:3) nachentfärbt. (Farbreste im Hintergrund der Gele verfälschen die densitometrische Proteinbestimmung.) Die Färbeintensitäten der einzelnen Proteinbanden wurden mit einem Joyce-Loebl-Mikrodensitometer auf Papier konstanter Dicke aufgezeichnet. Die Flächen der einzelnen Gipfel, die jeweils einer Proteinbande im Gel entsprachen, wurden ausgeschnitten und gewogen.

Dies wurde jeweils für Protein I und II mit verschiedenen Mengen, deren Proteingehalt zuvor nach der Methode Abschn. 2.6.2. genau bestimmt wurde, durchgeführt und in Abb. 3 dargestellt. Die Eichkurven in Abb. 3 wurden jeweils durch zwei voneinander unabhängigen Meßreihen ermittelt. Die einzelnen Meßpunkte wichen bis zu $\pm$ 10% voneinander ab. Im Bereich von 1 bis 6 µg Protein I und 1 bis 12 µg Protein II pro Gel sind die Eichkurven linear. Mit Hilfe dieser Eichkurven konnten dann unbekannte Proteinmengen von Protein I bzw. II, die auf Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt wurden, bestimmt werden.

Das molare Kettenverhältnis von Protein I zu Protein II wurde nach elektrophoretischer Auftrennung der Hülsenproteine aus ihren Anfärbeintensitäten folgendermaßen bestimmt: Bei 10 µg Hülsenprotein, das elektrophoretisch aufgetrennt wurde, ergaben densitometrische Messungen:

50 mg Papier für Bande I und
30 mg Papier für Bande II (Abb. 14).

Mit Hilfe der Eichwerte (Abb. 3) entsprechen

50 mg Papier der Bande I 5.4 µg Protein I und
30 mg Papier der Bande II 3.7 µg Protein II.

Mit den Molekulargewichten 40 000 für Protein I und 28 000 für Protein II ergeben sich folgende molare Mengen:

5.4 µg Protein I $= 1.35 \times 10^{-4}$ µMol Protein I
3.7 µg Protein II $= 1.32 \times 10^{-4}$ µgMol Protein II.

Für Polypeptidketten, die nicht rein isoliert werden können, ist es nicht möglich, Eichkurven aufzunehmen. Deswegen können für sie auch keine absoluten Proteinbestimmungen durchgeführt werden. Wohl ist es aber möglich, relative Messungen vorzunehmen,

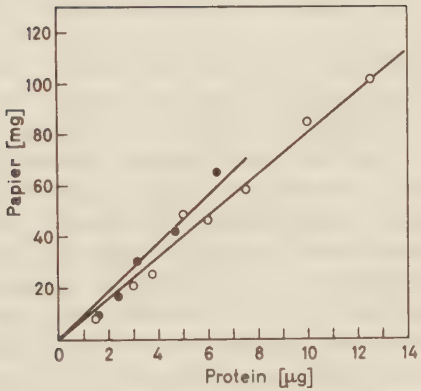


Abb. 3 Eichkurven zur Bestimmung der Proteinmengen von Protein I und Protein II in Polyacrylamidgelen

Abszisse: 1 bis 20 µg Protein I (-.-.-) bzw. Protein II (-o-o-), wurden gelelektrophoretisch nach Abschn. 2.5.1. aufgetrennt, die Gele mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt und die Banden nach gründlichem Entfärben der Gele densitometrisch ausgemessen. Ein Maß für den Proteingehalt in den Banden ist die vom Densitometer aufgezeichnete Papierfläche, die ausgewogen wurde (Ordinate:mg Papier). Die Steigungen der beiden Eichkurven geben die Anfärbbarkeit von Protein I bzw. II an.

um Änderungen von Proteinmengen in einzelnen Banden verfolgen zu können; z.B. traten während der Bromcyanspaltung von Protein I für die einzelnen Bromcyanfragmente solche Änderungen auf (Tab. 7).

Die Menge des mit Bromcyan gespaltenen Proteins I, die auf Gele aufgetragen wurde, war für alle Proben mit unterschiedlicher Spaltungsdauer konstant (30 µg).

2.7. Bestimmung von Radioaktivität

Radioaktive Lösungen (maximal 0.1 ml) wurden auf Filterpapierscheibchen MN 218 (Macherey, Nagel + Co., Düren) aufgetragen, an der Luft bei Raumtemperatur eingetrocknet und in Szintillationsgläschen zu 5 ml Szintillationsflüssigkeit (4.0 g Omnifluor in 1 l Toluol p.a.) gegeben. Die Radioaktivität, gemessen als Impulse pro Minute (IpM), wurde im Packard Tricarb Liquid Scintillation Spectrometer bestimmt. Die Zählausbeute (IpM) betrug bei ^{35}S 50% und bei ^{3}H 10%.

2.8. Methode zur Bestimmung von Na-dodecylsulfat, das nach mehrmaliger Extraktion mit Aceton von den Hülsenproteinen nicht entfernt werden konnte

10 mg Hülsenproteine wurden in 1.0 ml radioaktiv markiertem (^{35}S) 1%-igem Na-dodecylsulfat unter Erhitzen (5 Minuten bei 100°C) gelöst. Die eingesetzte Radioaktivität betrug 2.8 µCi. Nach Entnahme einer Probe für die Messung der Radioaktivität wurde das restliche Protein 4 x mit je-

weils 5 ml Aceton extrahiert. Die Radioaktivität wurde in den Extrakten sowie in dem extrahierten Protein gemessen, das zuvor mit 1%-iger Na-dodecylsulfatlösung (nicht radioaktiv markiert) wieder in Lösung gebracht wurde.

2.9. Molekulargewichtsbestimmung durch Na-dodecylsulfat-Gelelektrophorese (43)

Zur Bestimmung des unbekannten, scheinbaren Molekulargewichts eines Proteins wurde das Protein mit einer Reihe von Standardproteinen (Tab. 1) elektrophoretisch aufgetrennt. Die Gelelektrophorese wurde hierbei nach einer modifizierten Art (Abschn. 2.5.1. (27, Methode II)) von Weber und Osborn (44) durchgeführt. Zur Markierung der Front wurde der Farbstoff Pyronin Y verwendet (43). Die R_f-Werte wurden logarithmisch, die Molekulargewichte der Standardproteine linear aufgetragen. Die Meßpunkte der Proteine liegen auf einer Geraden (Abb. 10). Bestimmt man für ein Protein mit unbekanntem Molekulargewicht den R_f-Wert, so kann man sein scheinbares Molekulargewicht an der Geraden aus dem Schaubild (Abb. 10) ablesen.

Tabelle 1: Standardproteine zur Molekulargewichtsbestimmung

Protein	Herkunft	Molekulargewicht
1 Rinderserumalbumin	Behringwerke	67 000
2 Ovalbumin	Boehringer Mannheim	45 000
3 Lactatdehydrogenase	" "	36 000
4 Chymotrypsinogen	" "	25 000
5 γ-Globulin (99% rein)	Sigma	23 500
6 Cytochrom c	Boehringer Mannheim	12 500

Fergusonbeziehung: $\log (R_f) = \log (M_o) - K_R T$

$$R_f = \frac{\text{Wanderungsstrecke von Protein im Gel}}{\text{Wanderungsstrecke von Pyronin Y im Gel}}$$

$$T = \frac{\text{g Acrylamid + g Bisacrylamid}}{\text{100 ml Lösung}}$$

Zwischen Acrylamid- und Bisacrylamid-Konzentration besteht folgende Beziehung:

$$c = \frac{100 \times \text{g Bisacrylamid}}{T}$$

In den hier durchgeführten Versuchen wurde für alle Gele c = 2.5 gewählt.

M_o = freie elektrophoretische Beweglichkeit
K_R = Retardationskoeffizient

Um zu prüfen, ob Proteine gemäß ihren Molekulargewichten in Polyacrylamidgelen wandern, wurde das nach Banker und Cotman beschriebene Verfahren (43) benutzt. Das "anormale" Verhalten von Proteinen beim Wandern in Gelen äußert sich darin, daß sie andere Positionen im Gel einnehmen, als durch ihre Molekulargewichte zu erwarten wäre. Dabei weicht das Verhältnis von dem Retardationskoeffizienten (K_R) zur freien elektrophoretischen Beweglichkeit (M_o) von den Werten der "normalen" Proteine ab, die auf einer Geraden liegen. Die Molekulargewichte der "normalen" Proteine, wie sie in der Na-dodecylsulfat-Gelelektrophorese bestimmt wurden, stimmen mit Werten überein, die unabhängig davon auf anderen physikalischen Messungen basieren. Experimentell wurde folgendermaßen verfahren: Für "normale"Proteine mit bekannten Molekulargewichten und für Proteine mit unbekannten Molekulargewichten, von denen man nur scheinbare Molekulargewichte elektrophoretisch bestimmen konnte, wurden die R_f-Werte für verschiedene Acrylamidkonzentrationen T ermittelt. Trägt man die Logarithmen der R_f-Werte gegen die Acrylamidkonzentration T in einem Schaubild für jedes Protein auf (graphische Darstellung der Fergusonbeziehung Abb. 11), und zieht eine Gerade durch die Meßpunkte eines jeweiligen Proteins, so erhält man aus der Extrapolation, wenn die Acrylamidkonzentration T gegen Null geht, die freie elektrophoretische Beweglichkeit (M_o) und aus der Steigung der Geraden den Retardationskoeffizienten (K_R). Anschließend trägt man für jedes Protein die Größen M_o gegen K_R auf (Abb. 12).

2.10. Zuckerfärbung

Für das Anfärben von Na-dodecylsulfat-haltigen Gelen erwies sich die Methode von Zacharius (46) als unzuverlässig. Es wurde infolgedessen nach einer Vorschrift von Glossmann und Neville (45) verfahren, nach der vor der Fuchsin-Färbung störendes Na-dodecylsulfat durch Extraktion mit 40%-igem Methanol entfernt wird.

2.11. Bromcyanspaltung (47)

Protein wird in 70%-iger Ameisensäure (2 mg/ml) gelöst, festes Bromcyan in 100-fachem Überschuß über die Methioninreste des Proteins dazugegeben und das Reaktionsgemisch bei 37°C bis zu 20 Stunden inkubiert. Nach der Inkubation, die in der Regel 3 bis 4 Stunden dauerte, (genauere Untersuchungen über die Inkubationsbedingungen für die Hülsenproteine sind im Abschn. 3.3.4.1. zu finden) wurde das Reaktionsgemisch mit Wasser von 0°C auf das 50-fache verdünnt, lyophilisiert, wieder in wenig Wasser aufgenommen und ein zweites Mal lyophilisiert. Das Material konnte direkt zur Analyse für die Na-dodecylsulfat-Gelelektrophorese verwendet werden.

2.12. Verdauung von Hülsenproteinen mit Carboxypeptidasen (48)

Hülsenprotein I bzw. II wurde bei 37°C in 200 mM Tris-Acetatpuffer pH 8.2, der 6 M Harnstoff und 0.5% Na-dodecylsulfat enthielt, gelöst.

Die Lösung wurde anschließend 16 Stunden lang bei 4°C gegen ein 500-faches Volumen 200 mM Tris-Acetatpuffer pH 8.2 unter Zusatz von 10^{-5} M Phenylmethansulfonylfluorid dialysiert, wobei der Dialysepuffer 2 x gewechselt wurde.

Das Verhältnis Enzym zu Substrat wurde wie 1:3 gewählt, um innerhalb weniger Stunden (8 Stunden) Endwerte für die Verdauung zu bekommen (vergl. Tab. 6 und 9). Die Verdauung erfolgte bei 37°C und wurde durch Zugabe gleichen Volumens 10%-iger Trichloressigsäure bei 0°C beendet. Der Niederschlag wurde mit 1.0 ml 10%-iger Trichloressigsäure gewaschen und die Trichloressigsäure aus den vereinigten Überständen mit Äther entfernt. Die trichloressigsäurefreien Überstände wurden am Rotationsverdampfer eingeengt, in Probenpuffer für den Aminosäureanalysator aufgenommen und die Menge der einzelnen Aminosäuren bestimmt (Abschn. 2.6.2.). Als Kontrollen wurden Enzym, Substrat und auch Puffer, der für die Inkubation verwendet wurde, jeweils für sich in gleicher Weise wie das Verdauungsgemisch behandelt. Ein Aliquot von der Kontrolle, Protein ohne Zusatz von Carboxapeptidase, wurde vor der Trichloressigsäurefällung einer sauren Hydrolyse unterworfen. Die Aminosäureanalyse hiervon lieferte die exakte Substratmenge, die im Verdauungsansatz zugegen war. Um sicher zu gehen, daß das nur durch Carboxypeptidase zu verdauende Protein nicht durch Endopeptidaseeinwirkung unbekannten Ursprungs in einzelne Peptide zerfiel, wurden die Trichloressigsäureniederschläge 1 x mit Äther gewaschen und elektrophoretisch auf Abwesenheit solchen Zerfalles getestet.

2.12.1. Binden von den Carboxypeptidasen A und B an einen makromolekularen Träger

Beide Carboxypeptidasen wurden jede für sich analog der Vorschrift für Binden von Lactoperoxidase an Enzacryl AA (49) an dasselbe Trägermaterial gebunden. Anschließend wurden beide Enzyme überprüft, ob sie noch enzymatische Aktivitäten zeigten (50,51,52). Dazu wurde das Substrat Hippuryl-L-phenylalanin für Carboxypeptidase A und Hippuryl-L-arginin für Carboxypeptidase B mit dem entsprechenden trägergebundenen Enzym bei 37°C inkubiert. Nach bestimmten Zeiten (s.Tab. 2) wurden Proben der Testsuspension entnommen und

Tabelle 2: Umsatzgeschwindigkeit, gemessen als Extinktionsänderung, von Substrat durch Enzacryl AA gebundene Carboxypeptidasen

Inkubation bei 37°C in Stunden	Extinktionsänderung bei 254 nm Carboxypeptidase A	Carboxypeptidase B
0	0.00	0.00
0.1	0.11	0.05
1	0.34	0.17
6	0.39	0.22
16	0.45	0.24

das trägergebundene Enzym durch 5-minütiges Abzentrifugieren (0°C) bei 10 000 x g entfernt. Danach wurde die Extinktionsänderung bei 254 nm gemessen, die durch enzymatische Spaltung der Peptid-

bindung des entsprechenden Substrates hervorgerufen wurde.

Beide trägergebundenen Enzyme zeigten enzymatische Aktivitäten (Tab. 2).

2.13. N-terminale Analysen von Hülsenproteinen durch Dansylierung (37)

Hülsenproteine wurden vor der Auftrennung durch Na-dodecylsulfat-Gelelektrophorese nach Weiner et al. (37) dansyliert und danach elektrophoretisch aufgetrennt. Unter UV-Licht wurden die einzelnen fluoreszierenden Banden aus den Gelen herausgeschnitten, die dansylierten Proteine mit NH_4HCO_3-gepufferter 1%-iger Na-dodecylsulfatlösung bei 37°C extrahiert. Der größte Teil von Na-dodecylsulfat wurde aus den Proteinextrakten durch mehrmaliges Waschen mit Aceton entfernt (37). Der gelbliche Niederschlag wurde in wenig Wasser aufgenommen, gegen Wasser dialysiert, gefriergetrocknet und hydrolysiert. Die dansylierten Aminosäuren wurden im Mikromaßstab auf Polyamidplatten chromatographisch aufgetrennt (37).

2.14. Tryptische Verdauung und "Fingerprints" (48)

2.14.1. Tryptische Verdauung und "Fingerprints" (Methode I)

Vor der Verdauung mit Trypsin wurden die Proteine mit Perameisensäure oxydiert (53). Die "Fingerprints" wurden in geringfügiger Abweichung, wie unter (48) beschrieben, angefertigt. Oxydiertes Protein, in 0.1 M NH_4HCO_3 pH 8.5 suspendiert (0.3

mg/ml), wurde mit 1/50 der Proteinmenge mit Trypsin, das mit TPCK behandelt war, bei 37°C bis zu 16 Stunden in Anwesenheit von 0.05% NaN_3 verdaut (Zugabe von NaN_3 im Verdauungsgemisch sollte Wachstum von Mikroorganismen vermeiden.) Nach 16 Stunden war das Verdauungsgemisch gelöst. Nach Lyophilisation wurden 3 mg des Peptidgemisches in 70%-iger Ameisensäure (maximal in 0.2 ml) gelöst und auf Whatman 3 MM Papier aufgetragen. Zuerst wurde die elektrophoretische Auftrennung durchgeführt, danach wurden die Peptide in der zweiten Dimension chromatographisch getrennt. Die "Fingerprints" wurden für argininhaltige Peptide nach Sakaguchi angefärbt, anschließend erfolgte die Ninhydrinfärbung nach Easley (54). Um die nicht-beständigen ninhydringefärbten Peptidflecken für fotografische Zwecke zu erhalten, wurden die Papierbögen in 1%-igem $Cu(NO_3)_2$ in Äthanol getränkt und anschließend getrocknet (55).

2.14.2. "Fingerprints" tryptischer Peptide von radioaktiv markierten Proteinen

Perameisensäureoxydierte Hülsen (53), deren Proteine tritiumhaltige Aminosäuren enthielten, wurden elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteinbanden mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. Die einzelnen Banden wurden aus den Gelen ausgeschnitten, das Protein eluiert (vergl.Abschn. 2.13.) und von Na-dodecylsulfat mit Aceton befreit (vergl.Abschn. 2.8.). Die auf diesem Weg isolierten Proteine konnten dann wie unter Abschn. 2.14.1. beschrieben tryptisch verdaut werden. Nach Lyophilisation und Aufnahme in geringem Volumen (maxi-

mal 200 µl) NH_4HCO_3 (0.01 M, pH 8.5) wurden Proben mit den tryptischen Peptiden bis zum Beginn der Überladung des Startflecks (ø 2-3 mm) auf Dünnschichtcelluloseplatten 20 x 20 cm (Merck, Darmstadt) aufgetragen. Zuerst wurden die Peptide in n-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5) chromatographiert. Nach dem Trocknen wurden die Platten mit Wasser-Essigsäure-Pyridin (289:10:1) besprüht und darin die Peptide bei 500 V, 8 mA 2 Stunden senkrecht zur Chromatographierichtung elektrophoretisch getrennt. Die getrockneten Chromatographieplatten wurden bei völliger Dunkelheit auf einem Röntgenfilm (Osray T4, Agfa/Leverkusen) bis zu 14 Tagen exponiert.

3. Ergebnisse

3.1. Ergebnisse aus Vorversuchen

3.1.1. Versuche zur Auftrennung der Hülsenproteine mit Hilfe von Ionenaustauscher-Säulenchromatographie

Hülsenproteine, die in nicht-ionischen Detergentien (Triton X-100, Brij 35) und Harnstoff gelöst waren, wurden an den Ionenaustauschern DEAE-Cellulose und Phosphocellulose gebunden. Durch Erhöhen der Ionenstärke gelang es, die Hülsenproteine wieder von den Säulen zu eluieren. Bei Anlegen eines linearen NaCl-Gradienten wurde bei etwa 1 M NaCl Protein von der Säule eluiert. Es erschien immer nur ein Hauptgipfel im Elutionsprofil (Abb. 4A, 4B), der mehr oder weniger ausgeprägte Schultern hatte. Trennversuche bei verschiedenen Temperaturen (Raumtemperatur, 30°C und 50°C) ergaben dieselben Elutionsprofile und die

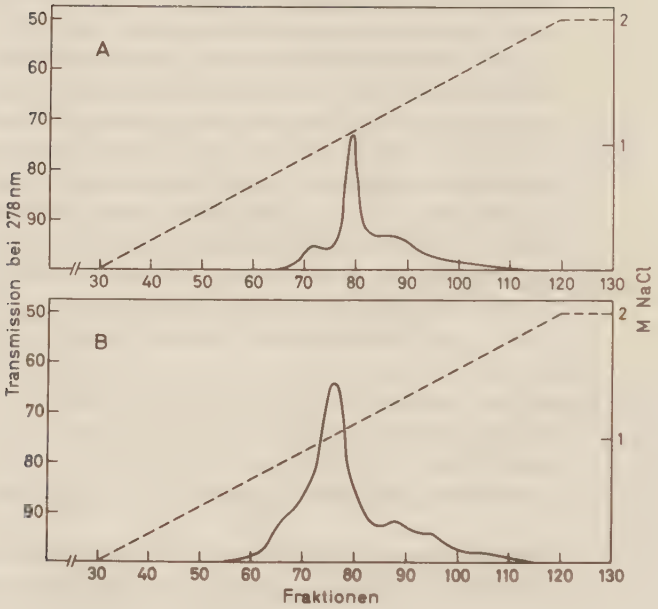


Abb. 4: Chromatographie von Hülsenproteinen auf DEAE-Cellulose

A) in Gegenwart von 5 M Harnstoff

B) in Gegenwart von 0.5% Brij 35

Erläuterungen ausführlich im Text der Abschn. 2.4.2.1. und 3.1.1.

Proteinfraktionen zeigten bezüglich ihrer Zusammensetzung dasselbe Bild. Wurden die einzelnen proteinhaltigen Fraktionen (nach Entfernen des NaCl durch Dialyse) elektrophoretisch analysiert, so zeigte

sich, daß qualitativ in allen Fraktionen die gesamten Hülsenproteine vorhanden waren. Quantitativ betrachtet wurden jedoch die einzelnen Proteinbanden verschieden intensiv angefärbt im Vergleich zum Ausgangsmaterial. Das deutet darauf hin, daß die Proteine in den einzelnen Fraktionen in verschiedenen Mengenverhältnissen vertreten waren. So bekam man z.B. Fraktionen, die reich an Protein I und IV, aber arm an Protein II und III waren. Auf Grund dieser Proteinverteilung in den einzelnen Fraktionen erschien es jedoch wenig erfolgversprechend, eine Isolierung der Proteine auf dem Weg der Ionenaustauscher-Chromatographie weiter zu versuchen.

3.1.2. Vorversuche zur Isolierung und Charakterisierung von Hülsenproteinen

Anfänglich gelang es nicht, eines der Hülsenproteine in genügend großem Maßstab zu isolieren. Daher wurde der Versuch unternommen, die Proteine im kleineren Maßstab gelelektrophoretisch voneinander zu trennen.

3.1.2.1. Tryptische Peptide

Durch radioaktive Markierung der Hülsenproteine mit tritiummarkierten Aminosäuren können geringere Mengen von isolierten Proteinen und deren tryptischen Peptiden nachgewiesen werden als es durch Anfärben mit Ninhydrin möglich ist. Die Hülsenproteine hatten eine spezifische Radioaktivität von 2.5 µCi/mg (s.Abschn. 2.2). Nach elektrophoretischer Trennung der einzelnen Proteine und deren tryptischen

Spaltung, sollte die Radioaktivität ausreichen, gut sichtbare Flecken auf Autoradiographien der tryptischen "Fingerprints" zu geben. Mit den Proteinen der einzelnen Banden wurden beträchtliche Mengen an Begleitmaterial (Acrylamid-Gestandteile und Coomassie Brilliant Blue) aus den Gelen herausgelöst. Dieses Begleitmaterial konnte nicht ohne größeren Verlust an radioaktiven Peptiden entfernt werden. Somit war es nicht möglich, das Peptidgemisch in genügender Menge auf die Cellulosedünnschichtplatten aufzutragen, um die einzelnen Flecken gut voneinander getrennt mit ausreichender Radioaktivität zu bekommen. Durch das störende Begleitmaterial waren die Startflecken auf den Dünnschichtplatten schon bei geringer Radioaktivitätsmenge überladen. Auf den Autoradiographien waren die Startflecken wesentlich stärker geschwärzt als alle anderen Peptidflecken.

3.1.2.2. N-terminale Analyse der Hülsenproteine durch Markierung mit Dansyl-Chlorid

Dieser Versuch sollte zur Klärung beitragen, ob die Proteine in den einzelnen Banden der Gelelektrophorese homogen sind. Würde man pro Proteinbande mehrere dansylierte Aminosäuren finden, die nur von C-terminalen Aminosäuren aus Proteinen stammen können, so wäre damit die Heterogenität von Proteinen in einer Gelelektrophoresebande gezeigt. Der umgekehrte Fall, daß nur eine N-terminale, dansylierte Aminosäure gefunden wird, schließt nicht aus, daß noch verschiedene andere Polypeptidketten mit gleichen N-terminalen Enden oder substituierten N-terminalen Aminosäuren vorliegen.

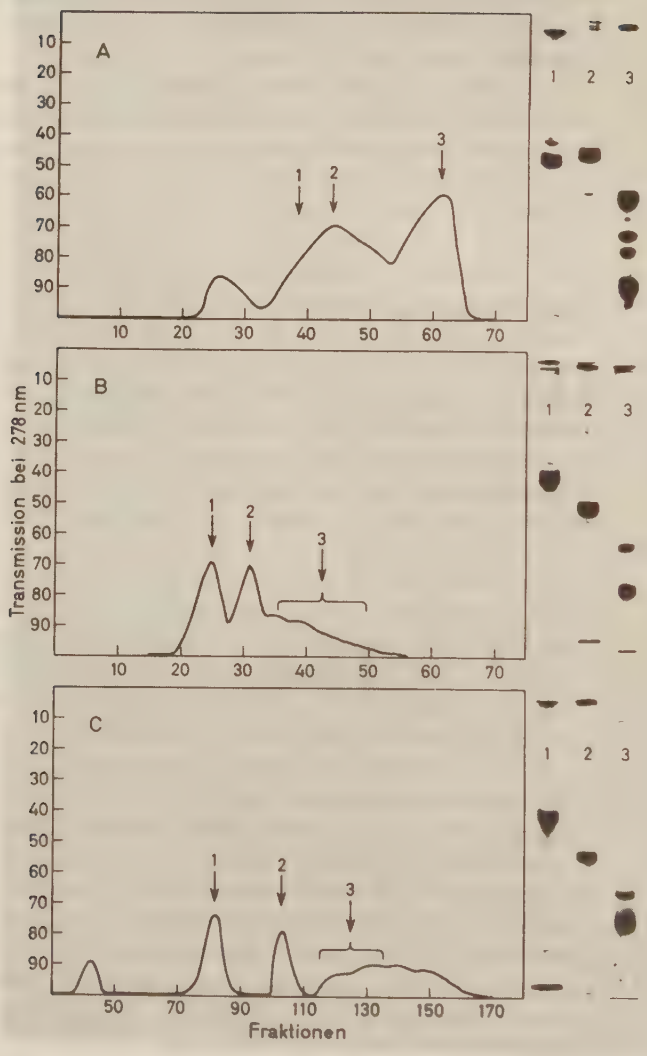
Bei diesem Versuch wurde keine N-terminale Aminosäure gefunden, was seine Ursache auch wieder in den vorhandenen Gelbestandteilen gehabt haben mag.

Insgesamt stellte sich heraus, daß mit den aus den Gelen eluierten Proteinen jedenfalls in einfacher Weise protein-chemische Untersuchungen nicht möglich waren.

3.2.1. Isolierung von Protein I und II

Protein I und II konnten schließlich durch Gelfiltration mit Sephadex oder Biogel bei geeigneter Typenwahl und in einem geeigneten Temperaturbereich isoliert werden (Abb. 5A,B,C,D). Bei Raumtemperatur wurde keine gut reproduzierbare Auftrennung der Hülsenproteine erhalten; die Proteinauftrennung verlief nur oberhalb 30°C (die Säulen wurden erst bei 50°C später bei 30°C betrieben) gut reproduzierbar, vorausgesetzt, daß die Temperaturkonstanz während der Trennung gewahrt blieb. Die Abhängigkeit des Trenneffektes von der Temperatur mag darauf zurückzuführen sein, daß die Hülsenproteine nur bei höherer Temperatur ($\geq$ 30°C) monomer vorliegen, dagegen bei Raumtemperatur miteinander Komplexe bilden und als solche gemeinsam von den Säulen eluiert werden.

Zur Abtrennung von Protein I erwies sich Sephadex G200 als geeignet. Protein II wurde mit Sephadex G100 von den übrigen Hülsenproteinen abgetrennt. Mit diesem Gel war es auch prinzipiell möglich, Protein I zu isolieren. Protein I wurde aber dicht hinter dem Leervolumen von der G100-Säule eluiert. Da das Leervolumen Nicht-Proteinmaterial enthielt, das wie die Proteine bei 278 nm


A
B
C
1
2
3
Transmission bei 278 nm
Fraktionen

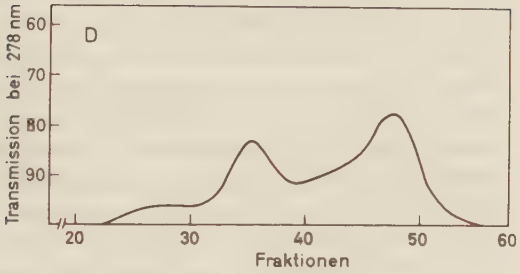


Abb. 5: Chromatographie von Hülsenproteinen auf verschiedenen Gelen mit Molekularsieb-effekt

Die Durchführung ist ausführlich im Abschnitt 2.4.1. beschrieben.

Hülsenproteinauftrennung auf: A) Sephadex G200, B) Sephadex G100, C) Biogel P200 und D) Biogel P100. Bei A) und C) zuerst eluiertes, UV-absorbierendes Material enthält kein Protein. Bei D) wurde vor Auftrennung auf Biogel P100 Protein I durch eine vorangegangene Chromatographie auf Sephadex G200 bzw. Biogel P200 entfernt. Weitere Erläuterungen sind im Text (Abschn. 3.1.) zu finden.

absorbierte (s.Abb. 5A,C), war die Abtrennung von Protein I auf der G100-Säule durch eventuelle Beimengungen von dem Nicht-Proteinmaterial gefährdet. Daher wurde zur Isolierung von Protein I Sephadex G200 bevorzugt, auf dem Protein I nicht so dicht hinter dem Leervolumen aber genügend weit

von den restlichen Hülsenproteinen entfernt eluiert werden konnte.

Wurden proteinhaltige Fraktionen mit Aceton gefällt und dadurch der Niederschlag von Na-dodecylsulfat befreit, so fand man im lyophilisierten Rückstand der Acetonfällung einen Proteinanteil von nur etwa 20%. Gleichzeitig übersteigt dabei die Ausbeute an lyophilisiertem Material, das von der Säule eluiert und mit Aceton gefällt wurde, das für die Auftrennung eingewogene Hülsenmaterial (Tab. 3). Bei der Ausbeutebestimmung von Trockensubstanz wurden die Anteile von den Fraktionen die Protein III und IV enthielten, nicht berücksichtigt. Das hätte die Gesamtmenge an Trockenmaterial, die nach der Säulenelution erhalten wurde, noch erheblich vergrößert. Die Tatsache, daß wesentlich mehr Material nach der Säulenelution erhalten wurde, als man von der auf die Säule aufgetragenen Hülsenmenge erwartet hätte, legt die Vermutung nahe, daß es sich bei diesem Nicht-Proteinmaterial um Kohlenhydrat handelt, das vom Sephadex stammte. Dies konnte durch Zuckernachweis mit Anthron nachgewiesen werden. In Fraktionen von der Säulenelution, die kein Protein enthielten, fand man ebenfalls vergleichbare Mengen an Kohlenhydrat, wie sie für die proteinhaltigen Fraktionen gefunden wurden. Wurden die proteinhaltigen Fraktionen nach Entfernen von Na-dodecylsulfat mit Wasser gewaschen, so ging der Kohlenhydratanteil in Lösung und es blieb ein in Wasser unlöslicher Rückstand übrig, der zu 90 bis 95% aus Protein bestand (Tab. 3).

Der Vorgang, daß bei der Elution der Sephadex-Säulen fortwährend Kohlenhydrat aus dem Sephadex-Gel herausgelöst wurde, erklärt auch die Erscheinung, daß die anfängliche Trennschärfe von frisch gefüllten Sephadex-Säulen über Wochen hin laufend

Tabelle 3: Ausbeute von Protein I und II bei Säulentrennung auf Sephadex G100

Reinigungsschritte	Protein	Trockengewicht in mg	Proteingehalt in %
Hülsenmaterial	I,II,III und IV	250	70
Nach Chromatographie und Extraktion mit Aceton	I	160	20
	II	110	13
Nach Entfernen von Sephadex-Material mit Wasser	I	23	98
	II	12.5	95
Lyophilisierter Waschrückstand (Sephadex-Material)	I	135	5.3
	II	95	0

abnahm. Aus diesem Grunde versuchte ich, die Proteinauftrennung auf Biogel P200 und P100 durchzuführen. Dabei stellte sich heraus, daß die Trennung sogar besser als auf den Sephadex-Säulen war (Abb. 5C,D). Jedoch nahm auch hier infolge fortschreitenden Auflösungsprozesses des Biogelmaterials die Trennschärfe und damit einhergehende Trennkapazität ab. Das mit den Proteinen eluierte Biogelmaterial konnte in derselben Weise wie bei den Sephadex-Säulen mit Wasser entfernt werden.

Erwiesen sich die abgetrennten Proteine als elektrophoretisch nicht genügend sauber, so wurden sie unter gleichen Bedingungen rechromatographiert.

3.2.2. Eigenschaften von isoliertem Protein I und II

3.2.2.1. Löslichkeitseigenschaften

Beide Proteine sind, solange sie an der Hülsenmembran assoziiert sind, unlöslich in Wasser oder üblichen wässrigen Puffersystemen. Hülsen lassen sich auch nicht mit chaotropen Reagentien (56) wie Guanidiniumthiocyanat (6 M), Guanidiniumchlorid (6 M), Natriumthiocyanat (6 M) und Harnstoff (bis zu 8 M) lösen. Unvollständiges Herauslösen von Proteinen gelingt, wenn man Hülsen in 2% Triton X-100, das 5 mM EDTA enthält, suspendiert. Hülsen lösen sich vollständig in 1 bis 2%-iger Na-dodecylsulfat-Lösung bei 2-minütigem Erhitzen auf 100°C. Daraus können beide Proteine I und II mit Aceton gefällt werden (37); sie lösen sich dann nach Lyophilisation in 4 M Harnstoff. Jedoch bekommt

man die Hülsenproteine auch durch mehrmaliges Waschen mit Aceton nicht völlig frei von Na-dodecylsulfat, so daß die Löslichkeit der isolierten Proteine zum Teil auch von dem noch vorhandenen Detergenz bestimmt sein mag.

Tabelle 4: Extraktion von radioaktiv markiertem Na-dodecylsulfat (^{35}S-markiert) mit Aceton aus Hülsenproteinen nach 2.8.

Extraktionsschritte	Radioaktivität IpM	in %
Protein in radioaktivem Na-dodecylsulfat vor der Acetonextraktion	2 700 000	100
Überstände der		
1. Acetonextraktion	2 550 000	94
2. Acetonextraktion	40 000	1.5
3. Acetonextraktion	10 000	0.4
4. Acetonextraktion	3 000	0.1
Vereinigte Acetonextrakte	2 600 000	96
Protein nach 4-maliger Acetonextraktion	15 000	0.5

Mit dem Extrahieren ging kein Protein ins Aceton. Die fehlenden 4% an Radioaktivität bei den Acetonextrakten rühren von Schwankungen beim Messen der Volumina der Acetonextrakte her.

Bei einem Polypeptidkettenverhältnis I:II:IV ≈ 1:1:8-10 (27) ergibt sich ein rechnerisch ermitteltes mittleres Molekulargewicht von 15 000 pro Polypeptidkette. Im Ansatz befanden sich 0.7 µMol Hülsenproteine und vor der Acetonfällung 37 µMol Na-dodecylsulfat, nach den Acetonfällungen nur noch 0.5% der ursprünglichen Na-dodecylsulfatmenge, nämlich 0.14 µMol. D.h., auf etwa jede 5. Polypeptidkette kommt im Durchschnitt ein Molekül Na-dodecylsulfat.

Protein I und II lösen sich auch vollständig in 70 bis 100%-iger Ameisensäure bei Raumtemperatur, ohne daß sie innerhalb von 24 Stunden merklich zerfallen. Diese Löslichkeitseigenschaft wurde bei der Spaltung der Proteine mit Bromcyan ausgenutzt. Durch Erniedrigung des pH-Wertes alleine in wässrigem Milieu (0.1 M HCl) lösen sich beide Proteine nicht.

3.2.3. Nachweis von Zucker bei den Hülsenproteinen I und II

Beide Hülsenproteine I und II haben mindestens einen Proteinanteil von 95%. Daher ist von vornherein klar, daß der Kohlenhydratanteil bei beiden Proteinen nicht sehr hoch sein kann. Nach elektrophoretischer Auftrennung zeigen sie nur eine schwache, aber deutlich positive Reaktion bei der Zuckerfärbung nach Glossmann und Neville (45). In den Aminosäureanalysen findet man pro Mol Protein I ein Mol Glucosamin und pro Mol Protein II zwei Mole Glucosamin (Tab. 5 und 8). Dabei sollte man aber folgendes bedenken: Einmal ist nicht geklärt, ob das in der Aminosäureanalyse gefundene Glucosamin tatsächlich Glucosamin ist; es wurde nur an Hand seiner Position bei der Säulenelution identifiziert. Zum andern ist bisher nicht einwandfrei nachgewiesen, ob diese Kohlenhydratanteile kovalent an die Proteine gebunden sind. Die Anzahl der Glucosaminreste pro Mol Protein spricht immerhin bei beiden Proteinen dafür, daß diese Kohlenhydratanteile in stöchiometrischen Verhältnissen an das jeweilige Protein gebunden sind.

3.3. Protein I

3.3.1. Aminosäurezusammensetzung

Die Aminosäurezusammensetzung von Protein I ist in Tab. 5 aufgeführt. Die Häufigkeit der Aminosäurereste von Protein I wurde von verschiedenen Präparationen von E. coli B und von E. coli K12 durchgeführt. Zwischen den beiden Stämmen ist bezüglich der Aminosäurezusammensetzung kein Unterschied festzustellen. Von jeder Präparation wurden Analysen von sowohl "nativen" als auch mit Perameisensäure oxidiertem Material durchgeführt. Der Verlust an Threonin und Serin während der sauren Hydrolyse wurde aus den Werten der Hydrolysezeiten 24, 48, 72 und 96 Stunden extrapoliert (Abb. 6). Nach 96 Stunden war Threonin zu 15% und Serin zu 25% zerstört. Der Anteil an Valin, Leucin und Isoleucin stieg nach einer Hydrolysedauer von 72 Stunden nicht weiter an. Unterschiede von Analysedaten zwischen verschiedenen Analysepräparationen und zwischen verschiedenen Analysen derselben Präparation betrugen für Lysin und Arginin etwa 20%, für die anderen Aminosäuren zwischen 5 und 10%.

Cysteinsäure ist im Proteinhydrolysat von oxidiertem Protein I mit dem geringsten molaren Anteil vertreten. Die Anzahl von Aminosäureresten einer bestimmten Aminosäure kann pro Polypeptidkette nicht kleiner als eins sein. Setzt man daher den molaren Anteil von Cysteinsäure gleich eins, so errechnet sich für Protein I das minimale chemische Molekulargewicht zu etwa 40 000. Dieser Wert wurde auch gelelektrophoretisch gefunden (26).

Tabelle 5: Häufigkeiten von Aminosäureresten von Protein I aus Hülsen von E. coli

Mittelwerte der Analysen von Protein I

Aminosäuren	Reste[5] Mole pro 40 000 g	berechnet aus Anzahl an Analysen[1]	nächster ganzzahliger Wert
Lysin	17.03	13	17
Histidin	2.50	11	2 oder 3
Arginin	10.70	13	11
Asparaginsäure	49.22	13	49
Threonin[2]	19.70	11	20
Serin[2]	15.70	11	16
Glutaminsäure	26.34	12	26
Prolin	6.63	6	7
Glycin	43.25	13	43
Alanin	29.62	13	30
Halb-Cystein[3]	1.10	7	1
Valin	21.84	13	22
Methionin	4.02	7	4
Isoleucin	12.74	13	13
Leucin	22.83	13	23
Tyrosin	19.64	9	20
Phenylalanin	16.70	11	17
Glucosamin[4]	1.01	3	1

Tryptophan wurde nicht bestimmt

1) Nicht bei jeder Analyse waren alle Aminosäurereste berechenbar: Manchmal ging Tyrosin bei der Oxydation vom Protein verloren; bei einigen Aminosäuren waren die Gipfel zu klein oder es traten technische Störungen beim Analyseablauf auf.

2) Verluste bei der Hydrolyse wurden berücksichtigt (vergl.Abb.6)

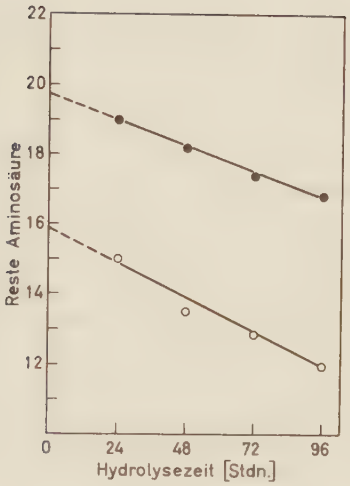


Abb. 6: Extrapolation von Threonin und Serin bei saurer Hydrolyse von Protein I

Berechnung der Aminosäurereste erfolgte gemäß der Vorschrift in Tab. 5, die einzelnen Meßpunkte sind Mittelwerte aus 11 Analysen; Threonin (-.-.-), Serin (-o-o-)

---

3) Halb-Cystein wurde als Cysteinsäure bestimmt

4) Nur durch seine Position bei der Elution identifiziert

5) Die Daten wurden auf folgende Weise berechnet: Die Analysenwerte (µM) wurden in µg umgerechnet und addiert. Für jede Aminosäure wurde dann ihr prozentualer Gewichtsanteil errechnet, aus dem ihr Molekulargewichtsanteil am Molekulargewicht der Polypeptidkette ermittelt wurde. Division dieses Anteils durch das Molekulargewicht der Aminosäure ergab die Zahl der angegebenen Reste.

3.3.2. Tryptische Peptide

Wie aus Tab. 5 ersichtlich ist, enthält das Protein I 28 Arginin- plus Lysinreste, davon sind 11 Arginin. Mit der "Fingerprint"-Technik nach Trypsinverdauung des oxidierten Proteins konnten ca. 25 ninhydrin-positive Peptide unterschieden werden, davon zeigten 8-9 Peptidflecken positive Sakaguchi-Reaktion (Abb. 7A-1, 7A-2).

Es war jedoch nicht möglich, selbst nach Trypsinbehandlung bis zu 16 Stunden bei 37°C, den mit Ninhydrin intensiv angefärbten Startfleck, der auch Argininfärbung zeigte, im "Fingerprint" weiter aufzutrennen. Peptide, die im "Fingerprint" am Start sitzengeblieben waren, konnten durch Chromatographie in einem alkalischen Lösungsmittelsystem (Pyridin-Isoamylalkohol-Wasser im Verhältnis von 30:30:35) (57) auch nicht weiter aufgetrennt werden.

Abb.7: "Fingerprints" tryptischer Peptide von den isolierten Proteinen I und II

Photographien der "Fingerprints": A-1 für Protein I, B-1 für Protein II; Länge des Startflecks beträgt 2 cm. Die Anfertigung des "Fingerprints" ist im Abschn. 2.14.1. beschrieben. In der schematischen Darstellung A-2 für Protein I und B-2 für Protein II sind die argininhaltigen Peptidflecken straffiert gezeichnet.

A-1
B-1
Chromatographie
Chromatographie

A-2
B-2
Chromatographie
Chromatographie

3.3.3. Carboxypeptidasen

3.3.3.1. Untersuchungen über die Bedingungen, unter denen die Hülsenproteine I und II von Carboxypeptidasen angegriffen werden

Vor Verwendung der Carboxypeptidasen A und B wurden ihre enzymatischen Aktivitäten gemessen (50,51,52). Es wurden nur Präparate mit 80 bis 100% der enzymatischen Aktivität verwendet, die vom Hersteller (Boehringer, Mannheim) angegeben wurden (Carboxypeptidase A 35-50 E/mg, Carboxypeptidase B 150 E/mg).

Um Protein I und II mit Carboxypeptidase verdauen zu können, mußten die Hülsenproteine erst in Lösung gebracht werden. Dies ging nur, wenn dem Puffersystem Na-dodecylsulfat zugesetzt wurde. Dies wiederum beeinträchtigte die enzymatische Aktivität der Carboxypeptidasen. Daher wurde der Na-dodecylsulfatgehalt durch Dialyse soweit verringert, daß sowohl Hülsenproteine noch in Lösung blieben als auch die enzymatischen Aktivitäten der Exopeptidasen groß genug waren, um innerhalb von 1 bis 8 Stunden Endwerte zu erreichen.

Da auf der anderen Seite proteolytischer Zerfall vom Substrat (besonders betroffen davon war Protein I) aus ungeklärter Ursache auftrat, empfahl es sich, das in Na-dodecylsulfat gelöste Protein bei 4°C unter Zusatz von einem Inaktivator für proteolytische Enzyme (Phenylmethansulfonylfluorid) nicht länger als 20 Stunden zu dialysieren, und während des Abbaus von Protein I und II mit Carboxypeptidase A und B das sonst übliche Verhältnis von Enzym zu Substrat 1:50 auf das 10- bis 20-fache zu erhöhen, um möglichst rasch die Abspaltung der C-terminalen Aminosäuren beenden zu können. Zur Kontrolle wurden während der

Kinetik der Aminosäureabspaltung durch die Carboxypeptidasen die Hülsenproteine auf Zerfall hin elektrophoretisch überprüft. Der proteolytische Zerfall konnte durch diese Bedingungen klein gehalten werden.

3.3.3.2. Carboxypeptidase B

Carboxypeptidase B spaltet von Protein I keine Aminosäure ab, d.h., Protein I hat keine basischen Aminosäure an ihrem C-terminalen Ende.

3.3.3.3. Carboxypeptidase A

Die Ergebnisse der Verdauung von Protein I mit Carboxypeptidase A sind in Tab. 6 und Abb. 8 zusammengefaßt. Daraus geht hervor, daß am Carboxylende von Protein I mit hoher Wahrscheinlichkeit Valin steht. Verfolgt man die Kinetik der Verdauung, so liegt die Zahl der Mole Valin, die durch Carboxypeptidase A freigesetzt wurden, pro Mol Protein I ($\sim$ 40 000g) innerhalb der ersten halben Stunde schon weit über eins, nämlich 1.6 bei 0.25 Stunden. Dagegen haben die übrigen durch Carboxypeptidase A freigesetzten Aminosäurereste ihren Sättigungswert noch nicht erreicht. D.h., Valin wurde vom Carboxylende als erste Aminosäure durch Carboxypeptidase A abgespalten, erst danach folgten die übrigen in der Tab. 6 aufgeführten Aminosäuren. In welcher Sequenz sie dem Valin folgen, läßt sich aus der hier aufgenommenen Kinetik (Abb.8) nicht klären. Dazu sind die Unterschiede von den molaren Mengen der abverdauten Aminosäuren innerhalb derselben Inkubationszeit zu gering. Plateau-Werte

sind erreicht, wenn folgende Mole Aminosäuren von 40 000 g Protein I freigesetzt worden sind: 1 Serin, 1 Glycin, 1 Alanin, 2 Valin, 1 Isoleucin, 0.6 Leucin, 1 Tyrosin und 1 Phenylalanin. Dieselben Zahlen wurden mit zwei unterschiedlichen Präparationen von Protein I erhalten.

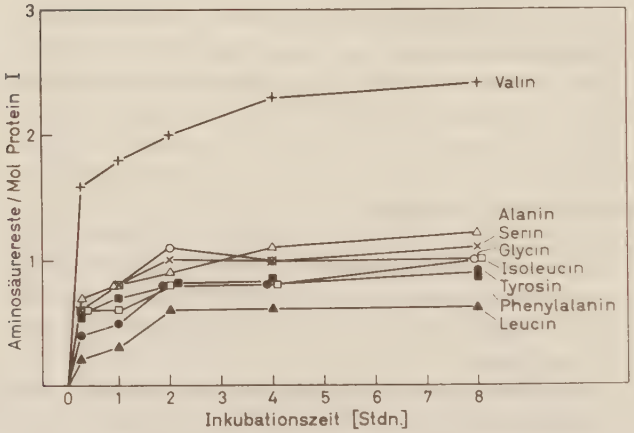


Abb. 8: Kinetik der Verdauung von Protein I mit Carboxypeptidase A

Die Inkubationsbedingungen von Protein I mit Carboxypeptidase A sind im Abschn. 2.12. beschrieben. Zuerst wird Valin abgespalten, insgesamt 2 Reste pro Mol Protein I (40 000g) bis das Plateau erreicht ist. Von den Aminosäuren Alanin, Serin, Glycin, Tyrosin, Isoleucin und Phenylalanin wurden je 1 Mol an Aminosäureresten pro Mol Protein I freigesetzt, von Leucin nur ca. 0.5 Mole. Die C-terminale Sequenz der Aminosäuren läßt sich aus dieser Kinetik nicht ersehen.

Tabelle 6: Abbau von Hülsenprotein I mit Carboxypeptidase A

Aminosäure	Menge nach Inkubation von 0.25	1	2	4	8 Stdn.
	in Molen pro 40 000 g				
Serin	0.6	0.8	1.0	1.0	1.1
Glycin	0.6	0.8	1.1	1.0	1.0
Alanin	0.7	0.8	0.9	1.1	1.2
Valin	1.6	1.8	2.0	2.3	2.4
Isoleucin	0.6	0.6	0.8	0.8	1.0
Leucin	0.1	0.3	0.6	0.6	0.6
Tyrosin	0.4	0.5	0.8	0.8	0.9
Phenylalanin	0.6	0.7	0.8	0.8	0.9

Aminosäuren, von denen weniger als 0.2 Mole pro 40 000 g Protein I abgespalten wurden, sind in dieser Tabelle nicht aufgeführt.

3.3.3.4. Carboxypeptidase A und B

Analysedaten von der Einwirkung beider Carboxypeptidasen gemeinsam oder nacheinander, konnten nicht verwertet werden. Die Kontrollwerte in einem Ansatz ohne Substrat, der nur die beiden Carboxypeptidasen enthielt, liegen bei den meisten Aminosäuren in derselben Größenordnung wie die Werte, die bei der Verdauung von Protein I mit beiden Carboxypeptidasen erhalten wurden. Bei einigen Aminosäuren (Threonin, Serin und Leucin) liegen die Kontrollwerte sogar über den Werten von der Verdauung von Protein I. Zudem erreichten die Werte für diejenigen Aminosäuren, die pro Mol Protein I abgespalten wurden, kein Plateau. Viele Werte waren von ganzen Zahlen, wie sie für homogene Proteine bei vollständiger Abverdauung der Aminosäuren gefordert werden, nach 8-stündiger Inkubation des Verdauungsgemisches noch weit entfernt. Eine Erklärung für dieses Verhalten dürfte folgende sein: Beide Carboxypeptidasen zerstören sich wegen ihrer hohen Konzentration im Inkubationsgemisch gegenseitig schneller, als von ihnen Protein I angegriffen wurde.

Um die gegenseitige Selbstzerstörung zu vermeiden, wurde versucht, beide Enzyme an einen makromolekularen Träger zu binden (Enzacryl AA), doch beide Carboxypeptidasen zeigten danach erhebliche reduzierte enzymatische Aktivitäten. Selbst nach 16-stündiger Einwirkung beider trägergebundener Enzyme auf Protein I wurden nur geringe Mengen an Aminosäuren freigesetzt. Somit konnten keine weiteren Aufschlüsse über den C-Terminus von Protein I erhalten werden, als schon durch Abbau mit Carboxypeptidase A alleine zu bekommen war.

3.3.4. Spaltung von Protein I mit Bromcyan

Da die Proteinkette mit dem Molekulargewicht um 40 000 nur 4 Methioninreste enthält, lag es nahe, durch Spaltung des Proteins mit Bromcyan zusätzlich Aufschluß über die Homogenität von Protein I zu bekommen. Die Bromcyanspaltung ergibt 4 kleinere Peptide (Abb. 9A-1). Um eine

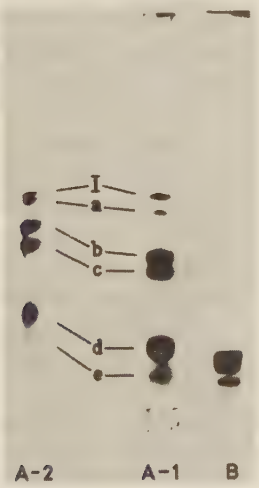


Abb. 9: Bromcyanfragmente von Protein I (A) und Protein II (B)

(A-1) Bromcyanfragmente aufgetrennt nach der Gelelektrophorese 2.5.1.; (A-2) dieselben Bromcyanfragmente aufgetrennt nach der Gelelektrophorese von Swank und Munkres (38) 2.5.2.; (I) kleine Mengen an ungespaltenem Protein I, (a) Zwischenprodukt, das während der Inkubation abnahm (vergl.Tab.7), (b,c,d,e) Bromcyanfragmente. Molekulargewichte der einzelnen Banden in der Reihenfolge von (I) nach (e): 39 000, 36 000, 27 000, 24 000, 14 000 und 9 000.
(B) 3 Bromcyanfragmente von Protein II (Doppelbande und darunterliegend eine schwächer angefärbte Bande), alle 3 Polypeptide haben Molekulargewichte unterhalb 10 000.

möglichst vollständige Bromcyanspaltung von Protein I zu bekommen, wurden verschiedene Reaktionsbedingungen getestet.

3.3.4.1. Einfluß von Temperatur und Inkubationsdauer

Bei Temperaturen über 37°C - getestet wurde Bromcyanspaltung bei 45°C - trat als konkurrierende Reaktion zur Bromcyanspaltung die saure Hydrolyse von Protein I in verstärktem Maße auf, was aus den Kontrollwerten Protein I in 70%-iger Ameisensäure ohne Bromcyan ersichtlich war. Protein I ist in 70%-iger Ameisensäure bei 37°C bis zu 24 Stunden nahezu stabil. Bei längerem Einwirken der Säure (gemessen wurden 36 und 48 Stunden) trat merklicher hydrolytischer Zerfall ein. Um den Einfluß der Inkubationszeit von Bromcyan auf Protein I zu sehen, wurde eine Kinetik der Bromcyanspaltung bei 37°C durchgeführt (Tab. 7). Mit diesen Daten soll gezeigt werden, wie sich innerhalb der Inkubationszeit von 0.1 bis 24 Stunden der Proteinanteil in den einzelnen Banden der Gelelektrophorese verschiebt. Über den absoluten Proteinanteil in den einzelnen Banden kann keine Aussage gemacht werden, da die spezifische Anfärbbarkeit der Polypeptide, die durch die Bromcyanspaltung von Protein I hervorgingen, unbekannt sind. Es konnte nämlich gezeigt werden, daß in Stärkegelelektrophorese (41) und in Polyacrylamidgelelektrophorese (42) der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue dieselben Mengen von verschiedenen Proteinen verschieden stark anfärbt. Die einzelnen Spaltprodukte konnten noch nicht isoliert werden, was für die Messung der spezifischen Anfärbbarkeiten notwendig wäre. Innerhalb des Bereiches, bei dem noch kein hydrolytischer Zerfall

Tabelle 7: Kinetik der Bromcyanspaltung von Protein I

Zeit in Stunden	Fläche in %, Maß für Protein innerhalb einer Bande						
Banden nach Abb. 9A	0.1	0.5	1.5	4	8	12	24
I	12	3	4	3	4	3	1
a	14	10	6	4	4	2	2
b	21	15	16	18	20	17	13
c	20	28	29	28	22	21	15
d	20	27	23	30	30	32	26
e	13	17	22	18	21	25	46

Die Zahlen geben den prozentualen Anteil der Fläche eines Gipfels wieder bezogen auf die Summe aller Gipfelflächen (I - e), die densitometrisch im Gel bestimmt wurden. Die Zahlen sind Mittelwerte von jeweils 2 Meßreihen. Die Abweichungen der Prozentzahlen < 10 betrug bis 30%, bei Prozentzahlen > 10 etwa 10%.

auftritt, lassen sich folgende Beobachtungen aus der Tab. 7 entnehmen:

1. Die Bromcyanspaltung ist im wesentlichen schon nach 10 Minuten abgeschlossen.
2. Bande (I) und Bande (a) (Abb. 9A) nehmen nach 1 Stunde kaum noch ab.
3. Ab etwa 10 Stunden verringern sich die Banden (b) und (c) zugunsten von den Banden (d) und vor allem (e).

Innerhalb einer Bromcyanspaltungsdauer von 3 bis 4 Stunden, wie sie gewöhnlich gewählt wurde, kann als sicher angenommen werden, daß kein Peptid der Hauptbanden (b), (c) und (d) ein Vorläufer der anderen ist.

3.3.4.2. Molekulargewichte der Bromcyanspaltprodukte von Protein I

Unter der Voraussetzung, daß die Bromcyanspaltung vollständig verlaufen ist, und daß es sich bei der Bande Protein I um ein einheitliches Protein handelt, sollte die Summe der Molekulargewichte der Spaltprodukte das Molekulargewicht des Ausgangsproteins der Bande I ergeben, nämlich etwa 40 000. Zu diesem Zweck wurden die scheinbaren Molekulargewichte mit Hilfe der Na-dodecylsulfat-Gelelektrophorese bestimmt (Abb. 10). Die daraus entnommenen Molekulargewichte der Polypeptide aus den Banden (b), (c), (d) und (e) sind 26 000, 24 000, 15 000 und ungefähr 8 000 (in derselben Reihenfolge). Bei zwei voneinander unabhängigen Messungen wichen die einzelnen Molekulargewichte bis zu 3 000 voneinander ab. Die Summe dieser Molekulargewichte ergibt nahezu den doppelten Wert, nämlich 70 000 bis 80 000, des Molekulargewichtes um 40 000 von Protein I.

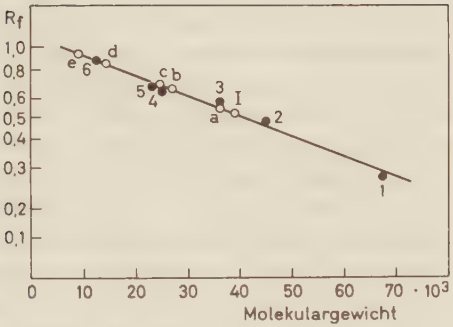


Abb. 10: Molekulargewichtsbestimmung der Bromcyanfragmente von Protein I

Bromcyanfragmente von Protein I und Standardproteine von Tab. 1 wurden gelelektrophoretisch getrennt (2.5.1.). Die R_f-Werte (Proteinwanderungsstrecke zur Pyronin Y-Wanderungsstrecke) wurden logarithmisch, die Molekulargewichte der Standardproteine linear aufgetragen. Für die Molekulargewichte der Bromcyanfragmente (vergl. Abb. 9A) wurden folgende Werte gefunden: (I) 39 000, (a) 36 000, (b) 27 000, (c) 24 500, (d) 14 000, (e) 9 000. Als Standardproteine dienten: (1) Rinderserumalbumin (67 000), (2) Ovalbumin (45 000), (3) Lactatdehydrogenase (36 000), (4) Chymotrypsinogen (25 000), (5) γ-Globulin (23 000) und (6) Cytochrom c (12 500).

Die Bromcyanspaltung von Protein I, außer vielleicht das Peptid aus Bande (c), wanderten höchst wahrscheinlich in der Na-dodecylsulfat-Gelelektrophorese gemäß ihren Molekulargewichten,

wie ein Vergleich zu den Standardproteinen (Rinderserumalbumin und Chymotrypsinogen) nach dem Verfahren von Banker und Cotman (43) zeigte (Abb. 11 und 12). Wie im Methodenteil (Abschn. 2.9.) näher ausgeführt wurde, haben alle Proteine, die gemäß ihren Molekulargewichten in der Gelelektrophorese wandern, dasselbe Verhältnis von freier elektrischer Beweglichkeit (M_o) zu (K_R), dem Retardationskoeffizienten, d.h., die Proteine, die "normales" Wanderungsverhalten auf den Gelen zeigen, liegen auf einer Geraden. Innerhalb der Meßgenauigkeit liegen alle Bromcyanbruchstücke zusammen mit den Standardproteinen auf einer Geraden, nur Protein der Bande (c) weicht ein wenig davon ab (Abb. 12). Durch Streuung bei den R_f-Werten (Abb. 11) sind die beiden Größen M_o und K_R auch mit Unsicherheiten behaftet. Zudem geben die Abweichungen von Bromcyanfragmenten von der Geraden (Abb. 12) kein exaktes quantitatives Maß für Molekulargewichtsabweichungen an, so daß insgesamt eine Aussage über die "wahren" Molekulargewichte der Bromcyanfragmente auf der Basis der Na-dodecylsulfat-Gelelektrophorese alleine nicht möglich erscheint.

Die Tatsache, daß die Summe der Molekulargewichte der verschiedenen Bromcyanspaltprodukte den doppelten Wert des Molekulargewichts von Protein I ergibt, warf die Frage auf, ob die Bromcyanfragmente (b) und (c) in ihrer Aminosäuresequenz identisch sind. Wenn dies der Fall wäre, käme man bei der Aufsummierung der Molekulargewichte der verschiedenen Bromcyanfragmente auf ein Molekulargewicht von etwa 50 000, was im Bereich des Molekulargewichtes von Protein I liegt. Wie können aber zwei Proteine, die dieselbe Aminosäuresequenz haben, auf der Gelelektrophorese verschieden weit laufen? Einige Proteine zeigen Ab-

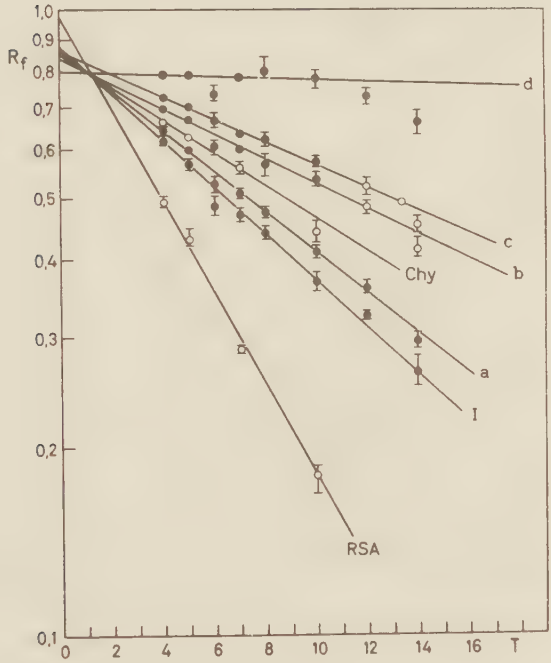


Abb. 11: Graphische Darstellung der Fergusonbeziehung für Rinderserumalbumin (RSA), Chymotrypsinogen (Chy) und die Bromcyanfragmente von Protein I

R_f-Werte (Ordinate) für RSA, Chy und Bromcyanfragmente wurden für verschiedene Acrylamidkonzentrationen T (Abszisse), bei denen die Polypeptide gelelektrophoretisch getrennt wurden, bestimmt. Für jedes Protein wurden die T-Werte gegen Null extrapoliert und ergeben dann die freie elektrophoretische Beweglichkeit (M_o); die Steigung der einzelnen Geraden ergibt den Retardationskoeffizienten (K_R) (43).

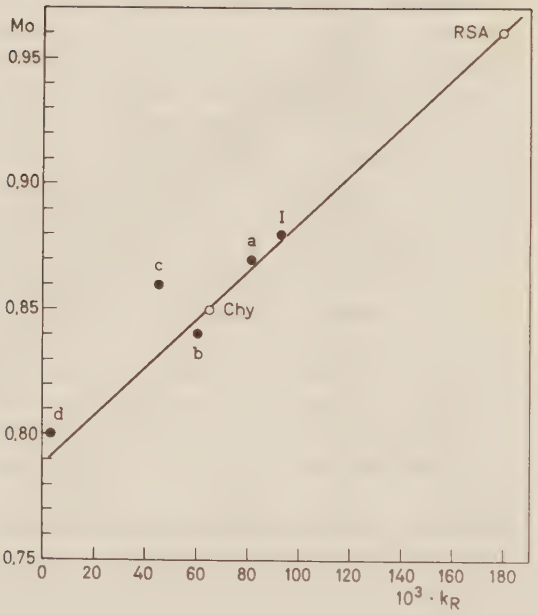


Abb. 12: Beziehung zwischen Retardationskoeffizienten (K_R) und freier elektrophoretischer Beweglichkeit (M_O) für die Polypeptide aus Abbilung 11

Bezüglich der Details s. Text in den Abschn. 2.9. und 3.3.4.2.

weichungen von ihren tatsächlichen Molekulargewichten, wenn die Molekulargewichte auf Grund ihrer Beweglichkeit bei der Gelelektrophorese bestimmt werden (43 und dort angegebene Literatur). Z.B. zeigen Polypeptidketten mit Kohlenhydrat als

Substituenten (43,60) auf der Gelelektrophorese falsche Molekulargewichte, weil die Wechselwirkung von Na-dodecylsulfat und Protein durch den Kohlenhydratanteil gestört wird. Das "major" Glykoprotein von menschlicher Erythrocytenmembran wandert auf Na-dodecylsulfat-Polyacrylamidgelen langsamer als man auf Grund seines Molekulargewichtes erwarten würde, was auf eine sehr geringe freie elektrophoretische Beweglichkeit zurückzuführen ist (43,60), was seinerseits wahrscheinlich darauf beruht, daß das Protein weniger Na-dodecylsulfat gebunden hat als unsubstituierte Polypeptidketten gleicher Länge (78).

Im Falle der Bromcyanspaltprodukte von Protein I wäre es denkbar, daß das Bromcyanfragment (b) einen Substituenten enthielte, der beim Fragment (c) fehlen würde; dies könnte dann zu einem scheinbaren Molekulargewichtsunterschied zwischen den beiden Fragmenten (b) und (c) führen, die in ihrer Aminosäurezusammensetzung doch identisch wären. Der Substituent dürfte jedoch nicht sehr groß sein, da Protein I einen Nicht-Proteinanteil von nur ca. 5% hat. Wie aus der Zuckerfärbung und der Aminosäureanalyse von Protein I hervorging (vergl.Tab. 5), scheint der Kohlenhydratanteil nicht sehr groß zu sein. Unklar blieb aber, ob dieser Zuckeranteil von ca. 5% tatsächlich für einen solchen Molekulargewichtsunterschied, wie er für Fragment (b) und (c) gefunden wurde, nämlich um ca. 3 000, verantwortlich sein könnte. Dennoch wurde versucht, herauszufinden, an welchem Fragment (oder an welchen Fragmenten) sich Zuckeranteile nach der Bromcyanspaltung befinden.

Die Zuckerfärbung von den Bromcyanfragmenten von Protein I fiel negativ aus; bei Protein I war sie dagegen schwach positiv (vergl. 3.2.3.). Offenbar verhindert die Bromcyaneinwirkung unter

sauren Bedingungen (70%-ige Ameisensäure) anschließend die Zuckerfärbung, oder eine Verteilung der ohnehin bei Protein I nur schwach angefärbten Zuckerreste auf mehrere Bromcyanfragmente macht es unmöglich, die geringen Kohlenhydratmengen durch Zuckerfärbung in den Gelen sichtbar zu machen.

Um das Problem der Identität von Bromcyanfragment (b) und (c) von Protein I eventuell zu lösen, wurden nachfolgende Versuche angestellt:

i) Die Identität beider Fragmente wäre ausgeschlossen, wenn ihre Aminosäurezusammensetzungen sehr verschieden voneinander wären. Umgekehrt beweist gleiche Zusammensetzung beider Fragmente nicht deren Identität, denn ihre Aminosäuresequenzen könnten natürlich trotzdem verschieden sein. Dazu wurden die einzelnen Bromcyanfragmente gelelektrophoretisch voneinander getrennt und nach saurer Hydrolyse Aminosäureanalysen (40) von ihnen durchgeführt (vergl. Abschn. 2.6.2.). Fragment (d) ist wohl von (b) und (c) in der Zusammensetzung verschieden, während (b) sich nicht wesentlich von (c) bezüglich der Aminosäurezusammensetzung unterscheidet. Identität in der Aminosäuresequenz kann daher nicht ausgeschlossen werden; aber nur der Ausschluß von der Identität beider Fragmente (b) und (c) wäre alleine aussagekräftig.

ii) Es wurde von der Überlegung ausgegangen, daß durch Carboxypeptidaseeinwirkung auf Protein I vor der Bromcyanspaltung mindestens ein verkürztes Bromcyanfragment entstehen sollte. Von Carboxypeptidase A alleine wurden 9 Aminosäuren von Protein I freigesetzt, was einer Verkürzung eines Bromcyanfragmentes um etwa 1 000 Daltons entspricht. Durch zusätzliche Einwirkung von Carboxypeptidase B wäre eine weitere Verkürzung von Protein I zu erwarten

(falls Carboxypeptidase B überhaupt wirksam wird). Wegen des mangelhaften Abbaus von Protein I mit den Carboxypeptidasen A und B konnte keine genaue Abschätzung über die C-terminale Verkürzung von Protein I gemacht werden. Aber unter der Annahme, daß etwa 2 000 Molekulargewichtseinheiten durch die Carboxypeptidasen von Protein I abgebaut werden, sollte dies zu einem oder zwei Bromcyanfragmenten führen, die von den Carboxypeptidaseeinwirkungen auf Protein I stammen. Durch die Verkürzung durch die Carboxypeptidasen sollte das jeweilige Bromcyanfragment ein um 4 bis 8% kleineres Molekulargewicht als das entsprechende Bromcyanfragment ohne Carboxypeptidasebehandlung haben. Dieser Molekulargewichtsunterschied müßte sich elektrophoretisch feststellen lassen.

Würde man bei diesem Versuch zwei kleinere Bromcyanfragmente erhalten als im normalen Bandenmuster der Bromcyanspaltung von Protein I zu sehen ist (Abb. 9A), bedeutete dies, daß in Bande I Protein mit zwei verschiedenen Carboxylenden vorhanden wären. Das würde für zwei verschiedene Proteinketten sprechen oder für ein Protein, dessen C-terminales Bromcyanfragment zu etwa 50% einen Substituenten trägt, der für das veränderte elektrophoretische Verhalten verantwortlich wäre. Ginge entweder Fragment (b) oder (c) aus dem C-terminalen Teil von einem Protein I hervor, so würde nach der Carboxypeptidaseverdauung nur eines der beiden Bromcyanspaltprodukte eine veränderte Position gegenüber des normalen Bandenmusters von Bromcyanfragmenten auf der Gelelektrophorese zeigen. Allerdings denkbar, wenn auch unwahrscheinlich ist der Fall, daß von zwei verschiedenen Proteinen die C-terminalen Bromcyanfragmente gleich groß sind und die Carboxypeptidasen vor der Bromcyanspaltung von den beiden Carboxylenden her gleichviel Aminosäuren abverdauen.

Protein I mit beiden Carboxypeptidasen verdaut, ergab nach Bromcyanspaltung ein völlig unklares Bild, da die Carboxypeptidasen, die bei der Bromcyanspaltung von Protein I zugegen waren, ebenfalls durch Bromcyan gespalten wurden. Neben dem üblichen Bandenmuster der Bromcyanfragmente von Protein I traten zusätzlich weitere Banden auf, die von der Bromcyanspaltung der Carboxypeptidasen herrührten und teilweise dieselben Positionen wie die Bromcyanfragmente von Protein I innehatten. Um die Störung durch die Carboxypeptidasefragmente zu vermeiden, wurden beide Enzyme an einen Träger gebunden. Protein I wurde nach enzymatischer Behandlung von den trägergebundenen Carboxypeptidasen befreit und danach der Bromcyanspaltung unterworfen. Die Gelelektrophoresemuster der Bromcyanfragmente von Carboxypeptidase-behandeltem und Carboxypeptidase-unbehandeltem Protein I waren dieselben. Offenbar reichte die enzymatische Aktivität der trägergebundenen Carboxypeptidasen nicht aus, und/oder die Molekulargewichtsunterschiede waren nicht groß genug, um sie auf der Gelelektrophorese sichtbar zu machen, falls sie überhaupt bei den Fragmenten (b) und (c) zu erwarten waren. Es ist klar, daß die Lösung des Problems der scheinbaren Molekulargewichte der Bromcyanfragmente deren Isolierung erforderlich machen wird.

3.4. Protein II

3.4.1. Aminosäurezusammensetzung

Proben, die von Sephadex- und Biogelresten befreit waren, enthielten etwa 95% Protein.

Die Aminosäurezusammensetzung ist in Tab. 8 aufgeführt. Die Häufigkeit der Aminosäurereste, wie sie in Protein II auftreten, wurden aus verschiedenen Präparation gewonnen. Von jeder Präparation wurden sowohl "native" als auch mit Perameisensäure oxydierte Proteine verwendet. Der Verlust an Threonin und Serin wurde von 24, 48, 72 und 96 Stundenwerten der sauren Hydrolyse extrapoliert. 20% des Threonins und 28% des Serins waren nach 96 Stunden zerstört (Abb. 13). Der Anteil von Valin, Leucin und Isoleucin stieg nach 48-stündiger Hydrolyse nicht mehr an. Die Schwankungen bei Werten der verschiedenen Analysen waren dieselben, wie sie für Protein I gefunden wurden.

Cystein, das als Cysteinsäure in der Aminosäureanalyse bestimmt wurde, hatte den geringsten molaren Anteil im Hydrolysat von Protein II. Unter Annahme, es sei ein Mol Cystein pro Mol Protein vorhanden, ergibt sich ein minimales chemisches Molekulargewicht von etwa 28 000. Dieser Wert stimmt sehr gut mit dem Molekulargewicht überein, das gelelektrophoretisch gemessen wurde (26).

Zwei Mole Hexosamin wurden pro 28 000 g Protein II gefunden, aber wie im Falle von Protein I wurde nicht nachgewiesen, ob dieser Anteil an Aminozucker tatsächlich kovalent an Protein II gebunden ist.

Tabelle 8: Häufigkeiten von Aminosäureresten von Protein II aus Hülsen von E. coli

Mittelwerte der Analysen von Protein II

Aminosäuren	Reste[5] Mole pro 28 000 g	berechnet aus Anzahl an Analysen[1]	nächster ganzzahliger Wert
Lysin	9.63	9	10
Histidin	3.80	8	4
Arginin	6.82	9	7
Asparaginsäure	28.22	10	28
Threonin[2]	15.24	8	15
Serin[2]	9.66	9	10
Glutaminsäure	20.04	10	20
Prolin	13.13	7	13
Glycin	31.74	10	32
Alanin	23.73	10	24
Halb-Cystein[3]	0.97	5	1
Valin	16.84	10	17
Methionin	4.41	7	4
Isoleucin	10.01	10	10
Leucin	15.61	10	16
Tyrosin	11.73	7	12
Phenylalanin	7.22	10	7
Glucosamin[4]	2.02	3	2

Tryptophan wurde nicht bestimmt

Erläuterungen wie bei der Tab. 5

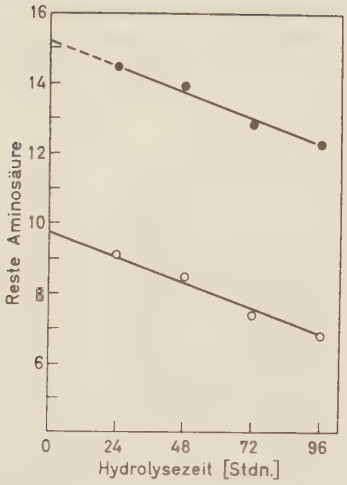


Abb. 13: Extrapolation von Threonin und Serin bei saurer Hydrolyse von Protein II

Berechnung der Aminosäurereste erfolgte gemäß der Vorschrift in Tab. 5; die einzelnen Meßpunkte sind Mittelwerte aus 8 bzw. 9 Analysen; Threonin (-.-.-), Serin (-o-o-).

3.4.2. Tryptische Peptide

In Protein II sind etwa 17 Arginin- plus Lysinreste vorhanden, davon sind etwa 7 Argininreste. "Fingerprints" von tryptischen Peptiden von perameisensäureoxydiertem Protein weisen ungefähr 20 ninhydrinpositive Peptide auf, wovon etwa

5 auch eine positive Sakaguchi-Reaktion zeigten (Abb. 7B-1 und 7B-2). Wie im Falle von Protein I blieb trotz 16-stündiger Trypsinbehandlung ninhydrinpositives Material am Startfleck liegen; es enthielt auch Arginin.

3.4.3. Carboxypeptidasen

Für die Verdauung von Protein II mit Carboxypeptidase B und mit Carboxypeptidase A plus B ergab sich dieselbe Situation, wie sie für Protein I beschrieben wurde. Die Ergebnisse von der Carboxypeptidaseverdauung sind in Tabelle 9 aufgeführt. Am C-terminalen Ende von Protein II steht Serin oder Valin. Innerhalb der ersten halben Stunde erreichten die beiden Aminosäuren schon ihren Endwert, nämlich Serin (1.0) und Valin (0.8), wogegen die Werte der übrigen Aminosäuren noch weiter anstiegen. Glutaminsäure, Glycin und Isoleucin erreichten nur langsam Werte von ca. 0.5 Molen freigesetzen Aminosäuren pro 28 000 g Protein II. Dieser Sachverhalt kann daran danken lassen, daß es sich wie bei Protein I um zwei Polypeptidketten handelt, oder aber daß aus unbekannten Gründen die letztgenannten Aminosäuren in verringertem Ausmaße abgespalten werden.

3.4.4. Spaltung von Protein II mit Bromcyan

Protein der Bande II enthält 4 Methionine (bezogen auf ein Molekulargewicht von 28 000). Behandelt man Protein II mit Bromcyan, so kann man maximal 5 Bromcyanfragmente von Protein II erwarten. Bei der Na-dodecylsulfat-Gelelektrophorese

Tabelle 9: Abbau von Hülsenprotein II mit Carboxypeptidase A

Aminosäuren	Menge nach Inkubation von 0.5	1	1.5	6 Stdn.
	in Molen pro 28 000 g			
Serin	1.0	1.0	0.8	1.0
Glutaminsäure	0.1	0.2	0.3	0.4
Glycin	0.3	0.4	0.4	0.5
Alanin	0.5	0.6	0.6	0.7
Valin	0.8	1.0	1.0	1.1
Isoleucin	0.3	0.3	0.3	0.4
Leucin	0.4	0.6	0.6	0.8

Aminosäuren, von denen weniger als 0.2 Mole pro 28 000 g Protein II abgespalten wurden, sind in dieser Tabelle nicht aufgeführt.

(Abb. 9B) können 3 Banden unterschieden werden. Eine Erklärung dafür, daß man weniger Bromcyanfragmente als erwartet fand, ist natürlich leicht zu finden: Von den 4 Methioninen können einige in der Aminosäuresequenz von Protein II so ungünstig liegen (endständig oder dicht beisammen), daß keine oder ganz kurze Peptidstücke entstehen, die gelelektrophoretisch nicht mehr nachzuweisen sind. Es könnte auch der Fall auftreten, daß verschiedene Bromcyanfragmente gleicher Größe entstehen, d.h., man findet nach der Gelelektrophorese nur eine Bande. Alle drei Banden wanderten in der Gelelektrophorese dem Cytochrom c etwas voraus. Ihre Molekulargewichte liegen demnach in einem Bereich von wenig unterhalb 10 000. Falls nicht mehr als drei Fragmente von dieser Größe bei der Bromcyanspaltung entstanden, ergibt sich kein Problem bei dem Aufsummieren der Molekulargewichte von den einzelnen Spaltprodukten. Diese Summe liegt im Molekulargewichtsbereich um 30 000 und damit im Bereich des Molekulargewichts vom Protein II.

3.5. Bestimmung des Polypeptidkettenverhältnisses von den Proteinen I und II in den Hülsen

Wenn die Polypeptidketten von Bande I und II tatsächlich homogen sein sollten, ist es interessant zu wissen, in welchem molaren Verhältnis die Polypeptidketten I und II in den Hülsen von E. coli vertreten sind. Dies ist für den Aufbau der äußeren Membran, die wie in der Diskussion 4.6. erörtert aus sich wiederholenden Proteinuntereinheiten bestehen kann (10,26,27), von Bedeutung. Auf Grund von quantitativer Bestimmung von radioaktivem

Protein in den einzelnen Banden wurde das molare Verhältnis der einzelnen Polypeptidketten in grober Näherung als I:II:IV ≈ 1:1:8-10 (27) bestimmt.

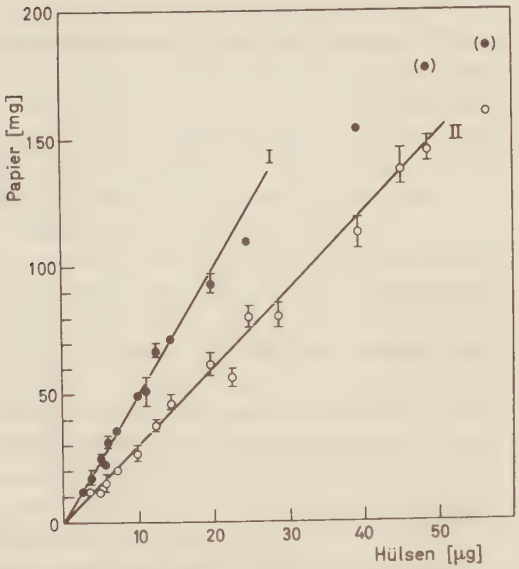


Abb. 14: Proteinbestimmung von Protein I und II in Hülsen / Bestimmung des Polypeptidkettenverhältnisses von Protein I zu Protein II

Verschiedene Mengen von Hülsen (Abszisse) aus E. coli K12 und E. coli B wurden einer Na-dodecylsulfat-Gelelektrophorese unterworfen und die Banden I und II densitometrisch ausgemessen (Ordinate); vergl.Abschn. 2.6.3.; Protein I (-.-.-), Protein II (-o-o-).

Durch die Isolierung von sowohl Protein I als auch Protein II war es möglich, für diese beiden Proteine das molare Peptidkettenverhältnis im Bandenmuster von elektrophoretisch aufgetrennten Hülsenproteinen mit Hilfe ihrer relativen Anfärbbarkeiten wesentlich genauer zu bestimmen.

Wie aus Messungen von Hülsenproteinen aus E. coli B und E. coli K12 hervorgeht (Abb. 14), findet man ein molares Polypeptidkettenverhältnis von I:II = 1:1.

4. Diskussion

4.1. Isolierung von Protein I und II

Um Aussagen über die Homogenität der zunächst nur elektrophoretisch getrennten Hülsenproteine machen zu können, mußten die Proteine der einzelnen Banden isoliert werden.

Zunächst war der Gedanke naheliegend, die Proteine im präparativen Maßstab gelelektrophoretisch aufzutrennen. Diese Methode erwies sich jedoch nur für die Gewinnung geringer Proteinmengen (bis ca. 1 mg) geeignet. Für die Untersuchungen der auf diese Weise isolierten Hülsenproteine mußten Methoden wie die Endgruppenbestimmung nach Dansylierung oder "Fingerprint" tryptischer Peptide im Mikromaßstab durchgeführt werden. Diese Versuche scheiterten im wesentlichen daran, daß neben den Hülsenproteinen beträchtliche Mengen an Polyacrylamid-Bestandteilen aus den Gelen herausgelöst wurden, die sich ohne größeren Verlust an Protein nicht mehr entfernen

ließen. Damit war klar, daß eine neue Isolierungsmethode für die Hülsenproteine gefunden werden mußte, die sie in größeren Mengen zu gewinnen erlaubte. Die Hülsenproteine konnten außer durch Na-dodecylsulfat-Gelelektrophorese auch durch Gelfiltration in Gegenwart von Na-dodecylsulfat nach ihren unterschiedlichen Molekulargewichten aufgetrennt werden. Für die Trennung erwiesen sich folgende Materialien als geeignet: Sephadex G200 für Protein I, Sephadex G100 vorzugsweise für Protein II, aber auch Protein I; noch schärfere Trennung konnte mit Biogel P200 bzw. Biogel P100 erzielt werden. Für die Isolierung von Protein III fand sich noch kein geeignetes Gel. Hingegen konnte Protein IV mit Biogel P60 abgetrennt werden (28).

Bei allen Trennungen war eine konstante Temperatur im Bereich von 30°C bis 50°C erforderlich, um gut reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Bei Raumtemperatur erfolgte keine vollständige Auftrennung der Hülsenproteine, was wahrscheinlich auf der Bildung von Aggregaten verschiedener Membranproteine beruht, die von den Säulen gemeinsam eluiert wurden.

Weder Kationen- noch Anionenaustauscher (Phosphocellulose bzw. DEAE-Cellulose) trennten die in Harnstoff oder in nicht-ionischen Detergentien (Triton X-100, Brij 35) gelösten Hülsenproteine voneinander. Entweder sind daher die Ladungsunterschiede bei den einzelnen Hülsenproteinen zu gering, oder sie gehen in den erforderlichen nicht-ionischen Detergentien nicht individuell in Lösung, d.h., die Hülsenproteine liegen als gelöste Komplexe vor.

Vergleicht man die Aminosäureanalysedaten von Protein I, II und IV im Hinblick auf ihre basischen und sauren Aminosäuren (Tab. 10), so fällt auf, daß jedes der 3 Proteine mehr saure als basische Aminosäuren nach saurer Hydrolyse aufweist, wenn auch von

Tabelle 10: Zusammenstellung von basischen und sauren Aminosäuren der Hülsenproteine I, II und IV

Aminosäuren	Aminosäurereste in Molprozent		
	Protein I	Protein II	Protein IV (29)
Lysin	5.3	4.5	8.8
Histidin	0.93	1.8	0
Arginin	3.4	3.2	7.0
basische Aminosäuren insgesamt	9.6	9.5	15.8
Asparaginsäure[1)]	15.2	12.7	25
Glutaminsäure[1)]	8.1	9.1	8.8
saure Aminosäuren insgesamt	23.3	21.8	33.8

1) Bei den Proteinen I und II ist noch unbekannt, wieviele Asparaginsäure- und Glutaminsäurereste in den Polypeptidketten als Amide vorliegen; bei Protein IV liegen von 14 Asparaginsäuren 6 als Asparagin und von 5 Glutaminsäuren 2 als Glutamin vor (29).

Protein I und II noch unbekannt ist, wieviel der sauren Aminosäuren als Amide vorliegen. Doch schließen die Daten nicht aus, daß die Verteilung von positiven und negativen Ladungen bei den Hülsenproteinen I, II und IV in etwa gleich sein könnte (Tab. 10).

4.2. Homogenität von Protein I und Protein II

Die nach der Methode II (27) elektrophoretisch aufgetrennten Proteine ließen sich in einem anderen Elektrophoresesystem nach Bragg und Hou (33) nicht weiter auftrennen (26). Das ist insofern von Bedeutung, als es diesen Autoren gelang, eine für einheitlich gehaltene Proteinbande mit einem Molekulargewicht um 40 000 von der äußeren Membran von E. coli (18,19,35,58,59) in 3 Banden aufzutrennen. Moldow et al. (31) zeigten auch, daß es sich bei dieser Bande um einen kompletten Artefakt handeln kann, indem sie Protein dieser Bande sowohl elektrophoretisch als auch chromatographisch in eine ganze Reihe von Banden weiter auftrennen konnten.

4.2.1. Protein I

Das auf den Cysteingehalt bezogene chemische Molekulargewicht ergibt einen Wert von rund 40 000, der mit dem durch Na-dodecylsulfat-Gelelektrophorese ermittelten Wert gut übereinstimmt. Natürlich stellen diese Fakten noch keinen strengen Nachweis hinsichtlich der fraglichen Homogenität dar. Sie erhalten erst in Verbindung mit anderen proteinchemischen Daten genügend Beweiskraft für die Homogenität.

Bei vollständigem Abbau des gelösten Protein I mit Trypsin sollte die Zahl der Peptide gleich der Summe von Arginin- plus Lysinresten plus eins sein. Auf Grund der unbekannten Zahl an Peptiden, die am Startfleck sitzen blieben, konnten jedoch keine genauen Angaben über die Zahl der bei Trypsinspaltung erhaltenen Peptide gemacht werden. Aus der Farbintensität des Startflecks zu schließen, ist es unwahrscheinlich, daß bei der Spaltung mit Trypsin mehr als doppelt soviele Peptide entstanden, als nach elektrophoretischer und chromatographischer Auftrennung gefunden wurden. Die Zahl der argininhaltigen Peptide, die man nachweisen konnte, blieb unterhalb der erwarteten Zahl. Da aber der Startfleck auf argininhaltige Peptide hinweist, ist auch deren Gesamtzahl ungewiß.

In ganz analoger Weise zum tryptischen "Fingerprint" sollte durch die Spaltung von Protein I mit Bromcyan Aussagen über die Homogenität von Protein I zu erhalten sein. Die Anzahl der Bromcyanfragmente, die gelelektrophoretisch nachgewiesen wurden, ist geringer als erwartet, was natürlich nicht gegen, sondern eher für die Homogenität des Proteins spricht. Bei vollständiger Spaltung ist für die Bromcyanfragmente zu erwarten, daß die Summe ihrer Molekulargewichte das Molekulargewicht des homogenen Proteins ergeben. Dies war bei Protein I nicht der Fall; die Summe der Molekulargewichte der Bromcyanfragmente war fast das doppelte als es bei einem homogenen Protein zu erwarten gewesen wäre. Dies widersprach der Auffassung, daß es sich bei Protein I um ein homogenes Protein handle. Zwei verschiedene Polypeptidketten würden jedoch ausreichen, die Daten der Bromcyanspaltung zu erklären.

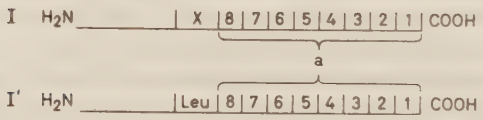
Eine Erklärung dafür, daß die Molekulargewichte der Bromcyanfragmente den doppelten Wert ergeben und

Protein I trotzdem homogen sein könnte, wurde darin erblickt, daß die Bromcyanfragmente (b) und (c) aus dem gleichen Peptidabschnitt von Protein I stammten aber verschieden modifiziert seien (z.B. Substitution eines der beiden Fragmente mit Kohlenhydratanteilen (43,60)). Die Untersuchungen, die ausführlich bei den Ergebnissen (Abschn. 3.3.4.2.) erörtert wurden, brachten keine Klärung der Frage nach der Identität von den Bromcyanbruchstücken (b) und (c). Einen endgültigen Aufschluß darüber wird man erst erhalten, wenn es gelingt, die Bromcyanfragmente voneinander zu trennen.

Bei den C-terminalen Untersuchungen wurden die von der Carboxypeptidase A abgespaltenen Aminosäuren quantitativ bestimmt. Je ein Mol (oder ein ganzzahliges Vielfaches davon) der abgebauten Aminosäurereste wurde erwartet, wenn die Verdauung ihren Endpunkt erreichte. Diese Forderung war bei Protein I bis auf Leucin erfüllt, von dem nur ein halbes Mol pro Mol Protein I freigesetzt wurde, was für Heterogenität (zwei Polypeptidketten oder auch mehr) spricht, falls keine anderen unbekannten Gründe für eine unvollständige Leucinabspaltung vorliegen. Falls tatsächlich Heterogenität bei Protein I vorliegt, so reichen zwei verschiedene Polypeptidketten pro Proteinbande I aus, um die Daten des Abbaus von Protein I mit Carboxypeptidase A zu erklären. In dem folgenden Schema sollen die hypothetischen Proteine I und I' zwei Polypeptidketten mit demselben Molekulargewicht sein. Beide Peptidkettenabschnitte (a) sind identisch. Von 1 Mol Protein I plus I' werden bei Verdauung mit Carboxypeptidase A jeweils ein Mol oder ein ganzzahliges Vielfaches davon von den ersten 8 Aminosäuren abgespalten, dann 0.5 Mole Leucin nur von Protein I'; von Protein I wird die Aminosäure X

(eine basische Aminosäure oder Prolin) durch Carboxypeptidase A nicht angegriffen. Die Ähnlichkeiten beider Polypeptidketten wären dann recht groß.

Schema:



Insgesamt gesehen bleibt für Protein I die Frage nach der Homogenität noch offen. Zwei Polypeptidketten wären jedoch ausreichend, alle gefundenen Daten zu erklären.

4.2.2. Protein II

Für Protein II gilt bezüglich des chemischen Molekulargewichts und den tryptischen Peptiden dasselbe, was schon für Protein I gesagt wurde.

Die Bromcyanfragmente passen sowohl in Zahl und mit ihren Molekulargewichten in das Bild von einem homogenen Protein.

Aus der Einwirkung proteolytischer Enzyme (Trypsin, Extrakt aus Dictyostelium discoideum und Pronase) auf Hülsen von E. coli kann man für die Homogenität des Proteins in Bande II folgenden Schluß ziehen (27): Bande II* (Molekulargewicht etwas unter 40 000) wird durch die drei verschiedenen enzymatischen Verdauungen jeweils zu einem

elektrophoretisch einheitlich wandernden Polypeptid verkürzt, was man nur von einem homogenen Protein erwarten sollte, denn ein Peptidgemisch als Substrat würde mit hoher Wahrscheinlichkeit bei der Einwirkung verschiedener Proteasen mehrere Polypeptidketten verschiedener Größe liefern (26, 27). Es ist unwahrscheinlich, daß die für die drei verschiedenen Proteasen spezifischen potentiellen Spaltstellen bei verschiedenen Polypeptidketten derart verteilt wären, daß genau gleich große neue Peptidstücke bei der enzymatischen Spaltung entstünden.

Aus den Daten von der Verdauung von Protein II mit Carboxypeptidase A ist keine eindeutige Aussage bezüglich der Homogenität möglich. Aus den Werten kann nicht entnommen werden, wieviele Mole Aminosäuren tatsächlich insgesamt abgespalten werden können, da bei der Verdauung von Protein II mit Carboxypeptidase A die Werte nur langsam ansteigen ohne daß feste Endwerte erreicht werden.

Aus den hier diskutierten Ergebnissen läßt sich die Schlußfolgerung ziehen, daß Protein II mit hoher Wahrscheinlichkeit aus einer Polypeptidkette besteht.

4.3. Polarität - Lipophilie

Von Capaldi und Vanderkooi (61) wurden Untersuchungen zur Polarität von Membranproteinen durchgeführt. Um die Polarität von Proteinen bestimmen zu können, wurden die Aminosäuren in zwei Klassen eingeteilt und damit ein "Polaritätsindex" für das jeweilige Protein errechnet (61). Die polaren Aminosäuren sind demnach: Asparaginsäure, Asparagin, Glutaminsäure, Glutamin, Lysin, Serin, Arginin,

Threonin und Histidin. Die restlichen Aminosäuren werden in der Gruppe nicht-polarer Aminosäuren zusammengefaßt. Das Aufsummieren von Aminosäuren der polaren Gruppe von einem Protein ergibt in Prozent ausgedrückt den Polaritätsindex (61).

Für Membranproteine, die in wässrigen Medien löslich waren und für solche, die nur in Gegenwart von Detergentien oder organischen Lösungsmitteln extrahiert werden konnten, wurde jeweils der Polaritätsindex errechnet (61). Dabei zeigte sich, daß der größte Teil (75%) der Membranproteine, die nur in Detergentien bzw. organischen Lösungsmitteln löslich waren, einen Polaritätsindex von $\leq$ 40% hatten. 25% der nur in Detergentien löslichen Proteine hatten so große Polaritäten 47 $\pm$ 6%), wie die meisten wasserlöslichen Proteine. Das Ausmaß der Polarität von Protein I und II beträgt 40.9 bzw. 40.8%. Das sind verglichen mit den Daten von Capaldi und Vanderkooi (61) keine besonders geringe Polaritäten. Protein I und II sind aber bei weitem nicht so polar wie die meisten in wässrigen Medien lösliche Membranproteine mit Polaritäten zwischen 45% und 52%.

Die beiden Proteine sind andererseits keineswegs besonders lipophil. Verglichen mit 3 willkürlich ausgewählten wasserlöslichen Proteinen ergeben sich folgende Werte für den lipophilen Aminosäureanteil:

Protein I	52 %
Protein II	53.8%
Hämoglobin(α-Kette)	48.9% (62)
Subtilisin	54.7% (63)
Tryptophan-Synthetase(α-Kette)	52.8% (64)

Der lipophile Aminosäureanteil gibt in Prozent folgende Aminosäuren des untersuchten Proteins an:

Pro, Gly, Ala, Val, Ile, Leu, Tyr, Phe, Met und Lys. In dieser Aufstellung wurde in allen Fällen der Tryptophananteil vernachlässigt, da er für beide Proteine I und II unbekannt ist.

Wie die Charakterisierung der isolierten Proteine I und II zeigt (Abschn. 4.4.), sind sie in ihrer Aminosäurezusammensetzung, Polarität und ihren Löslichkeitseigenschaften sehr ähnlich und erfüllen die Kriterien, die an "intrinsic" (65) oder "integral" (66) Membranproteine gestellt werden.

"Intrinsic" oder "integral" Membranproteine dringen in und manchmal durch die Lipidschicht (61 und die dort angeführte Literatur). Sie stehen in hydrophober Wechselwirkung mit Lipiden, d.h., ihr hydrophober Anteil liegt in der Lipidschicht eingebettet und hydrophile Teile des Membranproteins ragen in die wässrige Phase hinein. Man kann "intrinsic" Membranproteine nur mit Detergentien aus ihren Membranen befreien, oder sie mit anderen Reagenzien, die hydrophobe Wechselwirkungen zerstören (Proteindenaturierungsmittel, organische Lösungsmittel) aus der Membran herauslösen (66,67).

4.4. Vergleich von Protein I und II miteinander

Ein Vergleich von Protein I und II bezüglich ihrer Aminosäurezusammensetzung erscheint bemerkenswert: Abgesehen von Histidin, Prolin und Phenylalanin sind die prozentualen Häufigkeiten von denselben Aminosäuren beider Proteine ziemlich ähnlich (Tab. 11). Bei den von der Carboxypeptidase A freigesetzten Aminosäuren handelt es sich bei Protein I und II um vorwiegend dieselben hydrophoben Aminosäuren.

Tabelle 11: Relative Aminosäurezusammensetzung von Protein I und II

Aminosäuren	Aminosäurereste in Molprozent	
	Protein I	Protein II
Lysin	5.27	4.52
Histidin	0.93	1.81
Arginin	3.41	3.16
Asparaginsäure	15.22	12.67
Threonin	6.21	6.78
Serin	4.97	4.52
Glutaminsäure	8.07	9.05
Prolin	2.17	5.88
Glycin	13.33	14.47
Alanin	9.30	10.85
Valin	6.83	7.69
Methionin	1.24	1.81
Isoleucin	4.04	4.52
Leucin	7.14	7.24
Tyrosin	6.21	5.43
Phenylalanin	5.28	3.62
Halb-Cystein	0.31	0.45

Doch viel weiter reichen die Gemeinsamkeiten beider Proteine nicht. Die Bromcyanfragmente sind klar voneinander verschieden und die tryptischen "Fingerprints" lassen auch keine Teile von Identität erkennen (s.Abb. 7 und 9). Ob schließlich die genannte Ähnlichkeit von Bedeutung ist, erwartet Isolierung und Analyse von Protein II*, da ja II ein tryptisches "Kunstprodukt" darstellt.

4.5. Vergleich von Daten dieser Arbeit mit Ergebnissen anderer Autoren

Die Proteine der äußeren Membran aus Zellwänden von E. coli oder Salmonella typhimurium, die von verschiedenen Autoren (18,19,35,58,59) gefunden wurden, lassen sich vorläufig nur schwer vergleichen. Der eine Grund dafür ist, daß unterschiedliche Verfahren zur Anreicherung von Proteinen aus der äußeren Membran angewandt wurden, die zu Unterschieden in der Zusammensetzung von Fraktionen der Cytoplasma- bzw. äußeren Membran führten (18,19,35,58,59). Die Trennverfahren beruhten auf Zentrifugation von Membranfraktionen auf diskontinuierlichen Rohrzuckergradienten (18,19) zum Teil in Verbindung mit Löslichkeit bzw. Unlöslichkeit von Cytoplasmamembran bzw. äußerer Membran in Gegenwart von Triton X-100 und Magnesiumionen (58) oder auf unterschiedlichen Empfindlichkeiten von Proteinen der Cytoplasma- bzw. äußeren Membran gegenüber Proteasen (Trypsin und Pronase) (59). Der andere Grund für die schlechte Vergleichsmöglichkeit von Proteinen der äußeren Membran liegt in den unterschiedlichen Lösungsbedingungen bei gelelektrophoretischer Proteinauftrennung. Unterschiedliche Temperaturen im Bereich von 20°C bis 100°C und unterschiedliche Lösungsmittel, Nadodecylsulfat und N,N-dimethylformamid, denen die Proteine vor Aufbringen auf das Gel ausgesetzt wurden, ergaben unterschiedliche Bandenmuster (19,32).

Protein I und II* (aus dem durch tryptische Spaltung Protein II hervorgeht) sind sehr wahrscheinlich mit den Proteinen A und B, die von Bragg und Hou (33) beschrieben wurden, identisch (27). In einer kürzlich erschienenen Arbeit von

Reithmeier und Bragg (68) wurde das Protein B näher charakterisiert. Ein direkter Vergleich von Protein II mit Protein B (33,68) ist nicht möglich; man müßte Protein B mit Protein II* vergleichen und nicht mit dessen tryptischen Fragment Protein II. Jedoch lassen sich zwei grobe Unterschiede zwischen beiden Proteinen feststellen: Für Protein B fand Reithmeier und Bragg (68) kein Cystein und nur ein einziges Methionin, wohingegen für Protein II ein Cysteinrest und 4 Methioninreste gefunden wurden. Es bleibt daher fraglich, ob B in der Tat II*entspricht.

Weitere Vergleiche mit Beobachtungen zu den Hülsenproteinen mit Molekulargewichten um 40 000, die Schnaitman (69) gemacht hat, sind nicht möglich. Das elektrophoretische Bandenmuster von Proteinen, die mit Bromcyan behandelt wurden, läßt keine Ähnlichkeit mit denen erkennen, die in dieser Arbeit gemacht wurden. Ein Vergleich ist schon deswegen schwierig, weil Schnaitman seine Proteine mit nur zwei radioaktiven Aminosäuren markierte, über deren Häufigkeit in den einzelnen Bromcyanfragmenten nichts bekannt ist, was zu einem anderen Bandenmuster führen könnte im Vergleich zu einem Bandenmuster, das durch Proteinanfärbung sichtbar gemacht wurde. Die elektrophoretische Methode war in beiden Fällen gleich (38).

Schnaitman (69) findet für seine Proteinbande B mit dem Molekulargewicht ca. 42 000 bei Bromcyanspaltung hauptsächlich Peptide, deren Molekulargewichte um etwa 7 000 liegen, neben einem Bromcyanfragment mit einem Molekulargewicht etwas kleiner als 42 000. Diese Proteinbande B ließ sich in zwei neue Banden A und C aufspalten, die nach Bromcyanspaltung zwei voneinander verschiedene Peptidmuster haben. Proteinbande A lieferte 4 Hauptpeptide,

deren Molekulargewichte addiert darauf hinweisen, daß diese Bande aus zwei verschiedenen Proteinen besteht, wie auch eine Gelelektrophorese nach Bragg und Hou (33) zeigte (69). Von Bande C ist noch unbekannt, wieviel Proteine darin enthalten sind (69).

4.6. Bedeutung der Ergebnisse von Protein I und II für Determination der Zellform und für Membranmodelle

Die Zellhüllmembranen von E. coli enthalten Phospholipide, Lipopolysaccharid, Murein und Proteine. Wie in der Einleitung dieser Arbeit ausgeführt und von Henning und Schwarz ausführlich diskutiert wurde (10), ist zu vermuten, daß Zellhüllproteine in erster Linie für die Formgebung von Bakterienzellen verantwortlich sind. Mit "self assembly" und "sequential assembly" (vergl. Einleitung) von Strukturproteinen könnte man die morphologische Spezifität der Bakterienzellen erklären. Zwar ist es mit einem "self assembly" alleine nicht möglich zu kompletten E. coli-Stäbchen mit ihren halbkugelförmigen Zellpolen zu kommen. Dazu benötigt die Zelle über die in den Membranproteinen enthaltenen Informationen hinaus zusätzliche weitere Informationen. Dies wäre möglich unter der Annahme, daß die Zelle zu einer bestimmten Zeit im Zellcyclus Proteine synthetisiert, die dann auf irgendeine noch ungeklärte Weise Hülsenproteine zur Zellpolbildung veranlassen. Dieser Mechanismus ließe sich in einer nicht zu eng gefaßten Definition von "sequential assembly" miteinbeziehen.

Die Auffassung von dem Aufbau der formgebenden Membran der Bakterienzelle beinhaltet, daß Proteine regelmäßig in der Membran angeordnet sein sollten (10). Man könnte erwarten, daß nur wenige Proteinarten in festen molaren Verhältnissen zu Untereinheiten assoziiert eine Art Oberflächenkristall bilden, der eng mit den anderen Membranbestandteilen (Lipopolysaccharid, Lipid und Murein) verbunden ist. Von Brinton et al. (71) wurde gezeigt, daß das isolierte Protein einer äußeren Zellwandschicht (T-layer) von Bacillus brevis in vitro zu Röhren mit beidseitig offenen Enden reassoziieren konnte ("self assembly"). Dabei hatten die reassoziierten Röhren denselben Durchmesser wie die Zellen, von denen das Protein stammte (71). Für einen anderen Organismus (Spirillum serpens) mit solch einer Oberflächenschicht wurde jedoch nachgewiesen, daß das Bakterium auch ohne dieser Proteinschicht seine Gestalt ausbildet (72,73). Trotzdem erscheint es verlockend, in der E. coli-Hülle nach einer Art Proteinoberflächenkristall zu suchen, wie sie in äußeren Zellwandschichten bei vielen Bakterienarten gefunden wurden. Diese Art Oberflächenkristall könnte vielleicht als ein Element zur Formgebung der E. coli-Zelle betrachtet werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß für Protein I kaum mehr als zwei verschiedene Polypeptidketten vorliegen und daß Protein II mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Polypeptidkette darstellt. Dies bedeutet, daß 4 bis 5 verschiedene Proteine oder ihre Oligomeren in der äußeren Membran als sich wiederholende Untereinheiten vorliegen müssen, unter der Annahme, daß Protein III nur ein Protein enthält. Selbst wenn dies nicht der Fall ist, spielt das wahrscheinlich keine wesentliche Rolle, da Protein III mengenmäßig weniger zum Aufbau der Hülsenmembran beiträgt als alle übrigen Hülsenproteine.

Mengenmäßig reichen die Proteine I, II und IV bei weitem aus, eine Membran zu bilden, wenn die Proteine in einem hypothetischen Komplex dicht gepackt sind (Protein I:II:IV = 1:1:8-10) (27). Für die Proteine aus Bande I und II wurden durch neuere genauere Messungen (Abschn. 3.5.) dieselben molaren Verhältnisse bestätigt.

Welche Membranmodelle werden dieser Vorstellung vom Aufbau der äußeren Membran von E. coli gerecht und welche nicht, und wie gut passen die Daten von den Hülsenproteinen zu diesen Membranmodellen?

Das Modell der Membranstruktur von Singer und Nicolson, auch als "fluid mosaic model" bekannt (66), besteht aus einer Phospholipid-Doppelschicht, die die Matrix bildet in der globuläre "integral" Proteine zufällig verteilt sind. Bei diesen Membranproteinen handelt es sich um keine Strukturproteine, die über weite Bereiche in Kontakt miteinander angeordnet sind. Eine "long-range order" der Membranproteine, wie sie für die Formspezifität der Bakterienzelle notwendig erscheint, existiert in diesem Modell nicht.

Henning et al. (27) konnten zeigen, daß die Phospholipid-Doppelschicht nicht die Grundstuktur von Hülsenmembranen gramnegativer Bakterien ist. Das Phospholipid ist weder zur makroskopischen Strukturerhaltung noch für morphologische Erscheinung einer typischen Einheitsmembran erforderlich (Abb. 1) (26,27).

Wie von Haller und Henning (74,75) gezeigt wurde, konnten alle Proteine (I, II, III und IV) bei Hülsen und die Proteine bei ganzen E. coli-Zellen mit verschiedenen bifunktionellen Reagenzien, die nur sehr kurze Abstände überbrücken können, unter Beibehaltung der Zellform vernetzt werden.

Diese Beobachtungen schließen praktisch aus, daß das "fluid mosaic model" (66) für Membranstrukturen auf die äußere Membran von E. coli angewendet werden kann. Die Vernetzung der Hülsenproteine macht eine ausgedehnte Protein-Protein-Wechselwirkung über die ganze Oberfläche der äußeren Membran von E. coli (74,75) äußerst wahrscheinlich.

Von Vanderkooi und Green (76) und Capaldi und Green (67) wurde ein Modell aufgestellt, das einer Protein-Protein-Wechselwirkung gerechter wird als das von Singer und Nicolson beschriebene Modell (66). Das Modell (67,76) geht davon aus, daß "intrinsic" Proteine mehr oder weniger dicht ein- bis zweischichtig in die Membran gepackt sind. Die Zwischenräume zwischen den Proteinen sind mit Lipidmolekülen so gefüllt, daß die polaren Enden der Lipide in der Grenzschicht Membran-Wasser zu liegen kommen. Von den Proteinen wird angenommen, daß sie mehr oder weniger hydrophobe Bereiche an der Moleküloberfläche haben, die Wechselwirkung mit Lipidmolekülen erlauben. Selbst bei regelmäßiger Anordnung von Proteinen zu einem zweidimensionalen Kristall ist noch genügend Platz vorhanden, um alles Lipid in den Zwischenräumen zwischen den Proteinen aufzunehmen (76).

Die Vorstellung von Capaldi und Green (67), nach der Proteine regelmäßig zu einer Art Kristallstruktur angeordnet sind, scheint also am ehesten für die äußere Membran von E. coli zu passen. Da beide Proteine keine ausgesprochen niedrigen Polaritäten haben und nicht mit chaotropen Reagenzien aus der Membran herausgelöst werden können, könnte man annehmen, daß die polaren Seitenketten in den nativen Proteinen nach innen gewandt sind. Dies würde jedoch den Verlust von ihren Hydrathüllen

bedeuten, was energetisch ungünstig ist (76,77). Daher erscheint es eher wahrscheinlich, daß das Protein in seiner Tertiärstruktur Bereiche aufweist, die außen einen größeren Anteil als normal an apolaren Gruppen haben. Die hydrophoben Bereiche der Polypeptidketten können dann miteinander und mit den Lipiden in Wechselwirkung treten. Hinweise dafür, daß Proteine I und II innerhalb ihrer Polypeptidketten Sequenzbereiche verschiedener Polarität haben können, zeigen ihre C-terminalen Enden, die zum größten Teil aus unpolaren Aminosäuren bestehen wie Versuche mit der Carboxypeptidase A zeigten (Tab. 6 und 9).

Der hohe Proteingehalt der Membran (27), sowie Versuche zur Vernetzung von Proteinen aus der äußeren Membran von E. coli-Zellen und Hülsen (74,75), erlauben eine Art Kristallstruktur der Proteine in der äußeren Membran. Die geringe Anzahl von (ca. 4 bis 5) Proteinen, die zudem sehr ähnliche Eigenschaften haben und in einfachen stöchiometrischen Verhältnissen vorliegen, läßt es eher unwahrscheinlich erscheinen, daß diese Proteine in der Membran statistisch in einer Lipidmatrix verteilt sind. Vielmehr werden die Proteine oder ihre Oligomeren als sich wiederholende Untereinheiten ("repeating subunits") in der äußeren Membran regelmäßig angeordnet sein ("long-range order").

5. Zusammenfassung

Von Escherichia coli konnten stäbchenförmige Hülsen ("ghosts") isoliert werden, denen die Mureinschicht und die Cytoplasmamembran fehlte und deren Proteinanteil bei 50% lag. Elektrophoretisch konnten die Hülsenproteine in 3 Hauptbanden (I mit dem Molekulargewicht 40 000, II mit dem Molekulargewicht 28 000 und IV mit dem Molekulargewicht 10 000) und eine Nebenbande III aufgetrennt werden (26,27).

Protein I und II konnten durch Gelfiltration auf Sephadex- und Biogelen in Gegenwart von Nadodecylsulfat isoliert werden. Der Proteinanteil lag bei beiden Proteinen über 90%. Beide Proteine wurden durch Aminosäureanalyse, tryptische "Fingerprints", Abbau mit Carboxypeptidase A und Spaltung mit Bromcyan charakterisiert. Auf der Grundlage von Cysteinsäure ist das minimale chemische Molekulargewicht für beide Proteine dasselbe, das elektrophoretisch bestimmt wurde. Die Anzahl der Peptide, die bei der Verdauung der Proteine mit Trypsin gefunden wurden, widersprachen der Annahme nicht, daß es sich bei Protein I und II jeweils um homogene Proteine handelt. Jedoch ergibt die Summe der scheinbaren Molekulargewichte der Bromcyanfragmente von Protein I nahezu den doppelten Wert von Protein I, nämlich etwa 80 000. Es ist unwahrscheinlich, daß dies auf unvollständiger Spaltung beruht und es ist daher möglich, daß in Bande I zwei verschiedene Polypeptidketten vorliegen oder daß Bande I nur ein Protein enthält, bei dem die beiden größeren Bromcyanfragmente dieselbe Aminosäurefrequenz haben, aber unterschiedlich substituiert sind. Vorläufige Untersuchungen an den beiden großen Bromcyanfragmenten konnten dieses Problem nicht klären.

Die durch Carboxypeptidase A von Protein I abgespaltenen Aminosäuren: Serin, Glycin, Alanin, Isoleucin, Tyrosin und Phenylalanin ergeben 1 Mol, Valin 2 Mole pro 40 000 g Protein I. Es wird jedoch nur 0.5 Mole Leucin freigesetzt, was der Homogenität von Protein I ebenfalls widerspricht. Diese Daten schließen die Möglichkeit ein, daß Protein I aus zwei verschiedenen, aber dann sehr ähnlichen Polypeptidketten besteht.

Protein II ist ein tryptisches Fragment eines Proteins II* mit einem Molekulargewicht etwas unter 40 000. Die Summe der scheinbaren Molekulargewichte der Bromcyanfragmente von Protein II ergibt in etwa das Molekulargewicht von Protein II. Carboxypeptidase A setzt jeweils etwa 1 Mol Serin, Alanin, Valin und Leucin pro 28 000 g Protein II frei, aber nur etwa 0.5 Mole Glutaminsäure, Glycin und Isoleucin. Das bedeutet, wie bei Protein I, daß letztlich nicht ausgeschlossen ist, daß Protein II aus zwei Polypeptidketten bestehen kann, die aber angesichts von Resultaten von partiellem Abbau von Protein II durch Einwirkung verschiedener Proteasen auf Hülsen extrem ähnlich sein müßten.

Protein I und II haben überwiegend hydrophobe C-terminale Enden (besonders bei Protein I) und ähnliche Aminosäurezusammensetzung, jedoch ganz verschiedene Bromcyanfragmente und verschiedene tryptische Peptide. Beide Proteine sind insgesamt nicht extrem apolar oder lipophil. Trotzdem lösen sie sich aus der Membran heraus nur in Gegenwart von starken Detergentien (Na-dodecylsulfat) aber nicht in wässrigen Lösungen unter Zusatz chaotroper Reagenzien. Ihren Eigenschaften nach lassen sie sich als "intrinsic" oder "integral" Membranproteine klassifizieren. Es konnte bestätigt werden, daß in den Hülsen die Polypeptidketten im Verhältnis Protein I:II = 1:1 vorliegen.

Unabhängig davon, ob Protein I oder II aus ein oder zwei Polypeptidketten bestehen, müssen sie als sich wiederholende Untereinheiten ("repeating subunits") in der äußeren Membran von Escherichia coli-Zellhüllen vorliegen: Sie könnten so vielleicht einen Teil der formgebenden Struktur für die Escherichia coli-Zelle darstellen.

6. Literatur

1) Henning, U., Rehn, K., Braun, V., Höhn, B. und Schwarz, U. (1972) Eur. J. Biochem. 26, 570.

2) Schwarz, U. und Leutgeb, W. (1971) J. Bacteriol. 106, 588.

3) Kushner, D.J. (1969) Bacteriol. Rev. 33, 302.

4) Kellenberger, E. und Kellenberger-Van der Kamp, C. (1970) FEBS Letters 8, 140.

5) Laemmli, U.K. (1970) Nature (London) 227, 680.

6) Kellenberger, E. und Ryter, A. (1958) J. Biophys.Biochem.Cytol. 4, 323.

7) Murray, R.G.E., Steed, P. und Elson, H.E. (1965) Can. J. Microbiol. 11, 547.

8) dePetris, S. (1967) J. Ultrastruct.Res. 19, 45.

9) Weidel, W. und Pelzer, H. (1964) Advan. Enzymol. 26, 193.

10) Henning, U. und Schwarz, U. (1973) in: Bacterial Membranes and Walls (Ed. L. Leive), M. Dekker, New York, S. 413-438.

11) Brenner, S., Dark, F.A., Gerhardt, P., Jeynes, M.H., Kandler, O., Kellenberger, E., Klineberger-Nobel, E., McQuillen, K., Rubio-Huertos, M., Salton, M.R.J., Strange, R.E., Tomcsik, T. und Weibull, C. (1958) Nature 181, 1713.

12) Lederberg, J. (1956) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 42, 574.

13) Bazill, G.W. (1967) Nature 216, 346.

14) Brown, A.D. (1964) Bacteriol. Rev. 28 296 und die dort angegebenen Literaturzitate.

15) Henning, U., Braun, V. und Höhn, B., unveröffentlichte Ergebnisse.

16) Brown, A.D. und Cho, K.Y. (1970) J. Gen. Microbiol. 62, 267.

17) Miura, T. und Mizushima, S. (1968) Biochim. Biophys. Acta 150, 159.

18) Schnaitman, C.A. (1970) J. Bacteriol. 104, 890.

19) Osborn, M.J., Gander, J.E., Parisi, E. und Carson, J. (1972) J. Biol. Chem. 247, 3962.

20) Miura, T. und Mizushima, S. (1969) Biochim. Biophys. Acta 193, 268.

21) Bell, R.M. Mavis, R.D., Osborn, M.J. und Vagelos, P.R. (1971) Biochim. Biophys. Acta 249, 628.

22) White, D.A., Albright, F.R., Lennarz, W.J. und Schnaitman, C.A. (1971) Biochim. Biophys. Acta 249, 636.

23) Tomasz, A. (1971) Nature 234, 389.

24) Osborn, M.J., Gander, J.E. und Parisi, E. (1972) J. Biol. Chem. 247, 3973.

25) Birdsell, D.C. und Cota-Robles, E.H. (1967) J. Bacteriol. 93, 427.

26) Henning, U., Rehn, K. und Höhn, B. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 2033.

27) Henning, U., Höhn, B. und Sonntag, I. (1973) Eur. J. Biochem. 39, 27.

28) Garten, W. und Henning, U. (1974) Eur. J. Biochem. 47, 343.

29) Braun, V. und Bosch, V. (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 970.

30) Hantke, K. und Braun, V. (1973) Eur. J. Biochem. 34, 284.

31) Moldow, C., Robertson, I. und Rothfield, L. (1972) J. Membrane Biol. 10, 137.

32) Schnaitman, C.A. (1970) J. Bacteriol. 104, 882.

33) Bragg, P.D. und Hou, C. (1972) Biochim. Biophys. Acta 274, 478.

34) Shapiro, M.B., Siccardi, G.A., Hirota, Y. und Jacob, F. (1970) J. Mol. Biol. 52, 75.

35) Inouye, M. und Yee, M.L. (1973) J. Bacteriol. 113, 304.

36) Schnaitman, C.A. (1973) Arch. Biochem. Biophys. 157, 553.
37) Weiner, A.M., Platt, T. und Weber, K. (1972) J. Biol. Chem. 247, 3242.
38) Swank, R.T. und Munkres, K.D. (1971) Anal. Biochem. 39, 462.
39) Beisenherz, G., Boltze, H.J., Bücher, Th., Czok, R., Garbade, K.H., Meyer-Arendt, E. und Pfleiderer, G. (1953) Z. Naturforschung 8b, 555.
40) Houston, L.L. (1971) Anal. Biochem. 44, 81.
41) Fazekas de St. Groth, Webster, R. und Datyner, A. (1963) Biochim. Biophys. Acta 71, 377.
42) Vogel, O., Höhn, B. und Henning, U. (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 1615.
43) Banker, G.A. und Cotman, C.W. (1972) J. Biol. Chem. 247, 5856.
44) Weber, K. und Osborn, M.J. (1969) J. Biol. Chem. 244, 4406.
45) Glossmann, H. und Neville, D.M. (1971) J. Biol. Chem. 246, 6339.
46) Zacharius, R.M., Zell, T.E. Morrison, J.H. und Woodlock, J.J. (1969) Anal. Biochem. 30, 148.
47) Gross, E. (1967) Methods Enzymol. 21, 238.
48) Vogel, O. und Henning, U. (1971) Eur. J. Biochem. 18, 103.
49) Kuenzle, C.C. und Döbeli, M. (1973) Experimentia (Basel) 29, 800.
50) Folk, I.E., Piez, K.A., Carroll, W.R. und Gladner, J. (1960) J. Biol. Chem. 235, 2272.
51) Folk, I.E. und Schirmer, E.W. (1963) J. Biol. Chem. 238, 3884.
52) Firmenschrift von Worthington Biochemical Corp., Freehold, N.Y., USA.
53) Hirs, C.H.W. (1956) J. Biol. Chem. 219, 611.

54) Easley, C.W. (1965) Biochim. Biophys. Acta 107, 386.

55) Kaweran, E. und Wieland, T. (1951) Nature 168, 77.

56) Hatefi, Y. und Hanstein, W.G. (1969) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 62, 1129.

57) Wittmann, H.G. und Braunitzer, G. (1959) Virology 9, 726.

58) Schnaitman, C.A. (1971) J. Bacteriol. 108, 545.

59) Inouye, M. und Yee, M.L. (1973) J. Bacteriol. 112, 582.

60) Bretscher, M.S. (1971) Nature New Biology 231, 229.

61) Capaldi, A.R. und Vanderkooi, G. (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 930.

62) Braunitzer, G., Gehring-Müller, R., Hilschmann, N., Hilse, K., Hobom, G., Rudloff, V. und Wittmann-Liebold, B. (1961) Hoppe-Seyler Z. Physiol. Chem. 325, 283.

63) Smith, E.L., Markland, F.S., Kasper, C.B., Delange, R.J., Landon, M. und Evans, W.H. (1966) J. Biol. Chem. 241, 597.

64) Yanofsky, C., Drapeau, G.R., Guest, J.R., und Carlton, B.C. (1967) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 57, 296.

65) Vanderkooi, G. (1972) "Conference on Membrane Structure and Its Biological Implications" Eds. Green, D.E. und Danielli, J.F., Ann. N.Y. Acad. Sci., im Druck.

66) Singer, S.J. und Nicholson, G.L. (1972) Science 175, 720.

67) Capaldi, A.R. und Green, D.E. (1972) FEBS Letters 25, 205.

68) Reithmeier, R.A.F. und Bragg, P.D. (1974) FEBS Letters 41, 195.

69) Schnaitman, C.A. (1973) Arch. Biochem. Biophys. 157, 541.

70) Henning, U., Dennert, G., Rehn, K. und Deppe, G. (1969). J. Bacteriol. 98, 784.

71) Brinton, C.C., McNary, J.C. und Carnahan, J. (1969) Bacteriol. Proc., S. 48.

72) Murray, R.G.E. (1963) Can. J. Microbiol. 9, 381.

73) Buckmire, F.L.A. und Murray, R.G.E. (1970) Can. J. Microbiol. 16, 1011.

74) Haller, I. und Henning, U. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 2018.

75) Haller, I., Dissertation, Tübingen (in Vorbereitung).

76) Vanderkooi, G. und Green, D.E. (1970) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 66, 615.

77) Gibson, K.D. und Scheraga, H.A. (1967) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 58, 420.

78) Segrest, J.P., Jackson, R.L., Andrews, E.P. und Marchesi, V.T. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, 390.

7. Abkürzungen

Ci	Curie
E	Enzymeinheiten
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
IpM	Impulse pro Minute
Na-dodecylsulfat-Gelelektrophorese	= Natrium-dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TPCK	L-1-Tosylamid-2-phenyläthylchloromethylketon
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

Lebenslauf

Wolfgang Garten

19. September 1947	geboren in Tübingen
1958-1966	Schulbesuch im Kepler-Gymnasium zu Tübingen
1966-1971	Studium der Biochemie an der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen
Oktober 1971	Ablegung der Diplomprüfung in den Fächern: Organische Chemie, Physiologische Chemie und Mikrobiologie
Dez. 1971 - Juni 1972	Anfertigung der Diplomarbeit im Fach Biochemie am Max-Planck-Institut für Biologie, Abt. Henning, in Tübingen über das Thema: "Die Anzahl der katalytisch wirksamen Liponsäurereste im Pyruvatdehydrogenase-Komplex von Escherichia coli K12".
Juli 1972 - Aug. 1974	Anfertigung der Dissertation unter Anleitung von Prof. Dr. U. Henning, ebenfalls am Max-Planck-Institut für Biologie, Abt. Henning, in Tübingen

Meine akademischen Lehrer waren:

A. Anderer, E. Bayer, E. Bünning, W. Bues,
H. Diekmann, U. Feine, H. Frank, W. Frank,
A. Gottschalk, P. Hausen, U. Henning, E. Kallee,
G. Kortüm, W. Kraus, H. Krüger, H. Mauser,
H. Metzner, G.F. Meyer, F.P. Möhres, K. Mörike,
E. Müller, W. Rüdorff, W. Schlote, F. Schneider,
U. Schwarz, W. Schweizer, B. Schwemmle,
W. Seyffert, G. Weitzel, K. Wöhrmann, H. Zähner